

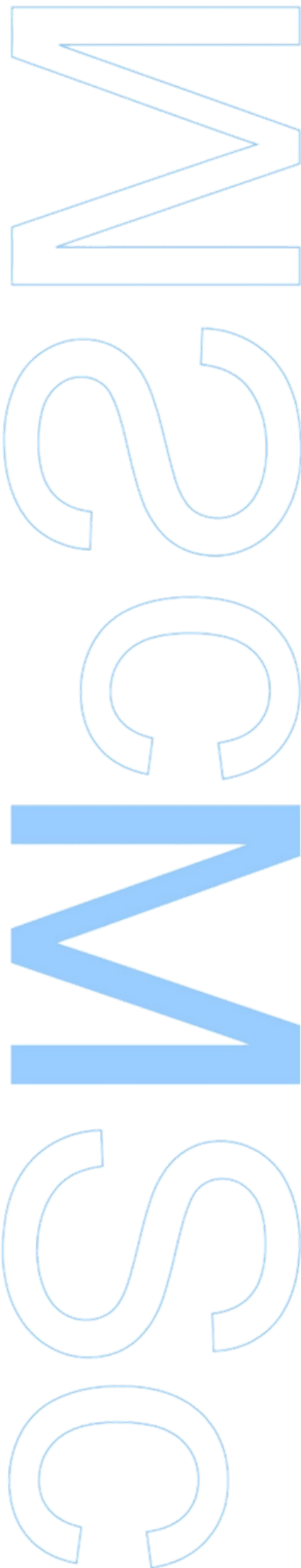


Regulação Diferencial do Cronotropismo e Inotropismo em Aurículas Isoladas de Ratazana a Contrair Espontaneamente por Purinorecetores P1 e P2

Sílvia Manuela Nogueira Marques

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Ciências da
Universidade do Porto, Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar
Bioquímica

2013



Regulação Diferencial do Cronotropismo e Inotropismo em Aurículas Isoladas de Ratazana a Contrair Espontaneamente por Purinorecetores P1 e P2

Sílvia Manuela Nogueira Marques

Mestrado em Bioquímica

Departamento de Química e Bioquímica

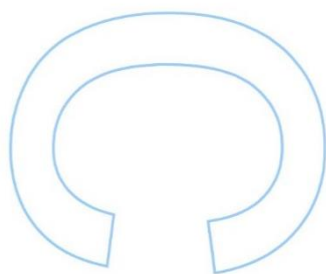
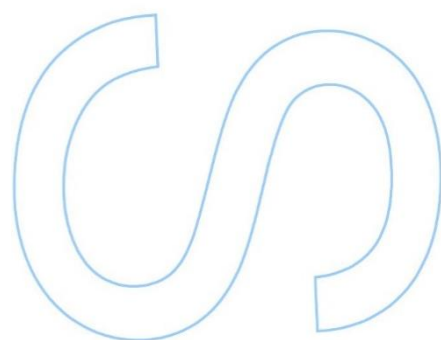
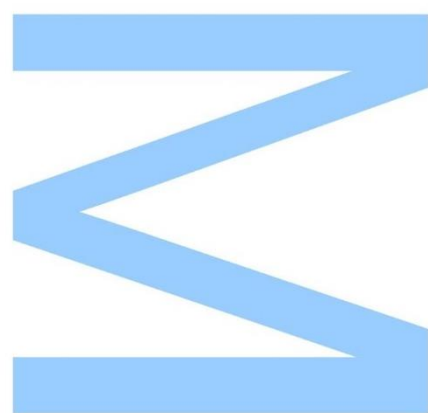
2013

Orientador

Prof. Doutora Ana Patrícia Fontes de Sousa, Professora Auxiliar,
ICBAS/UP

Co-orientador

Professor Doutor Paulo Correia de Sá, Professor Catedrático,
ICBAS/UP



Todas as correções determinadas
pelo júri, e só essas, foram efetuadas.

O Presidente do Júri,

Porto, ____/____/____

N

S

O

AGRADECIMENTOS

Há 5 anos aprendi uma canção...*“Era Setembro aqui cheguei, vim experimentar e gostei. Muita coisa aprendi, de olhos no chão oiço com devoção estes doutores que em ciências conheci...”*...mal eu sabia que todas estas palavras tinham um significado e se viriam a tornar numa grande realidade!

Tem sido um longo e árduo caminho esta minha viagem pela ciência. No Laboratório de Farmacologia e Neurobiologia do ICBAS / UP, onde pela primeira vez “pus mãos à obra” e onde com muita satisfação termino esta fase, aprendi tantas coisas que vão além do trabalho apresentando nesta tese. Foi um grande privilégio trabalhar ao lado de um grande grupo de professores e investigadores que juntos dão o seu melhor todos os dias para transmitir conhecimentos e contribuir para um futuro melhor. É assim um enorme prazer agradecer a toda esta grande família científica, que para além de tornarem esta tese possível, me ajudaram, e muito, a “construir” a pessoa que sou hoje.

Dizem que o dinheiro não é tudo, mas em ciência é um bem essencial...por isso, começo por agradecer à Fundação para a Ciência e Tecnologia de Portugal (FCT) que contribui financeiramente para a realização deste trabalho.

No entanto, para mim fazer ciência é muito mais do que isso...é ser capaz de aceitar e respeitar os outros, é saber crescer em grupo, é saber trabalhar não só com a cabeça, mas também com o coração. Tudo isto permite o sucesso de cada equipa e por isso estou profundamente agradecida a cada membro que faz parte dela. Assim, agradeço especialmente ao “pai desta família”, Professor Doutor Paulo Correia-de-Sá, a oportunidade fornecida em realizar esta etapa na “sua casa”, o Laboratório de Farmacologia e Neurobiologia do ICBAS. Para além do “abrigo” agradeço também todos os conhecimentos transmitidos que me permitiram desenvolver não só a capacidade de raciocínio como também o sentido crítico. Apesar das mil e umas coisas que sempre o ocupam, agradeço o tempinho que lá arranjava para mim. Um dia gostava de ser assim...esposa, mãe e uma grande cientista. É um exemplo a seguir.

Um outro agradecimento especial à Prof. Doutora Ana Patrícia pela excelente orientação proporcionada, pela boa disposição e amabilidade. Apesar do acompanhamento ao longo desta etapa ter sido descontinuado (claro que por um bom motivo, ou melhor por dois bons motivos) a preocupação foi contínua. Por outro lado, ajudou-me a tornar muito mais independente e autónoma cientificamente. Já os antigos diziam: “o que não nos mata torna-nos mais fortes”. Por isso, só tenho a agradecer. Agradeço também todo o tempo disponibilizado, toda a confiança

depositada e todos os conhecimentos transmitidos que me permitiram crescer a nível profissional. Por fim agradeço também a organização e entusiasmo contagiante que marcam a diferença.

De igual modo, não posso deixar de agradecer à minha “aurícula direita” pela geração de “impulsos” que faz o grupo “das cardíacas” funcionar. Tu és tão imprescindível nesta família, tal como a coordenação precisa das células miocárdicas no despoletar da contração. Agradeço a ajuda preciosa que sempre dispuseste desde a integração no grupo até ao final desta temporada. Agradeço-te por esse sorriso todos os dias, pelos conselhos, pela disponibilidade, pela amizade e simpatia. Obrigada sobretudo pela mão dada nas reuniões científicas e pelo sofrimento conjunto em todas as etapas. És a gargalhada constante e a irmã que nunca tive!

Agradeço também ao senhor doutor que muito me tem ajudado nestes últimos tempos. Obrigada por me ajudares a ver sempre um lado positivo nas coisas e por te preocupares comigo. Obrigada por esse optimismo todo, pelas piadas que contas e pelas belas canções que cantas...que tanto nos fazem rir!

Um especial “obrigado” à senhora minha vizinha da frente pela companhia ao longo das experiências, pelos conselhos e pela paciência infundável para todas as minhas lamúrias. Agradeço ainda por todos os raspanetes diurnos e pesadelos nocturnos. No fundo acho que também sou um bocadinho assim...Obrigada, foi como uma orientadora para mim, mas acima de tudo foi uma grande amiga!

Um obrigado muito especial às meninas do plexo e do cérebro que à sua maneira tornam esta família tão especial. Agradeço à restante e excelente equipa do Laboratório de Farmacologia e Neurobiologia, pela receptividade e pelo óptimo ambiente proporcionado todos os dias. São uma verdadeira família!

Quero e espero poder agradecer para o resto da minha vida aos amigos / irmãos que levo daqui. Agradeço por me acompanharem desde o início desta etapa, por me apoiarem em todos os bons e menos bons momentos neste estágio e principalmente pelas rizadas e brincadeiras juntos, mesmo quando tudo parecia mau. Agradeço-vos pela ajuda disponível, pela paciência todos os dias e por todos os almoços e passeios juntos. Apesar das zangas, dos ciúmes e de tudo o resto...sabem que vos levo no coração para sempre. Vocês são uma segunda família...são como escova e pasta dos dentes para mim (vêm sempre atrás de mim). Agradeço muito à minha ruiva preferida que sempre esteve ao meu lado e será uma amiga para a vida. Um agradecimento especial ao único loiro bonitão que estará sempre no meu coração como um irmão. Foste o meu abrigo nos últimos tempos, quem mais me apoiou e certamente quem mais acreditou em mim.

Quero agradecer à minha companheira de quarto dos últimos meses, pelo apoio incondicional e pela amizade que em tão pouco tempo se tornou tão especial. Agradeço pela comidinha que preparas para mim, pelos penteados que me fazes, pelos mimos que me dás...que muito me ajudaram e ajudam nesta fase. Obrigada por tudo o que fizeste e fazes por mim, por seres sincera e verdadeira comigo e, principalmente por esse espírito protetor que tens para comigo...és como uma mãe para mim!

Agradeço a todos os meus amigos, especialmente à minha pequena e à minha douradinha, que me acompanharam nestes últimos anos e pelo ombro amigo que sempre dispuseram. Foram uma vida junta estes anos, foram uma família para mim. Todos os momentos estão memorizados. Muito obrigada por tudo!

Quero agradecer às pessoas que mais amo (e sei que me amam) por estarem sempre comigo quer nos bons quer nos maus momentos durante esta difícil caminhada. Obrigada pela confiança e expectativas que sempre depositaram em mim e por nunca duvidaram que seria capaz. Obrigada por apoiarem o meu sonho e por nunca julgarem as minhas escolhas. Nem todas as palavras deste mundo chegariam para vos agradecer, porque mesmo quando eu não mereço estão comigo, porque mesmo quando erro continuam a ter orgulho em mim. São a família que todo o mundo deseja ter e eu sou a filha mais sortuda por vos ter.

Por último quero agradecer ao meu único efeito cronotrópico positivo desta tese, que apesar de longe está tão perto. Agora percebo que a distância não é nada e que o destino é tudo! Percebi que na vida, o estudo, o trabalho e os livros são importantes, mas tudo o resto ... enfim viver em sociedade é essencial e torna-nos pessoas únicas e diferentes. E foi assim...que numa das minhas brincadeiras entraste na minha vida e que a mudaste e mudarás para sempre. Conheceste uma menina e em tão pouco tempo tornaste-a uma mulher. Tenho muito a agradecer-te...por me ajudares a ver a vida de maneira diferente, por me ajudares a crescer e a tornar uma pessoa mais forte e melhor. E acima de tudo, agradeço-te por me incutires esse espírito aventureiro que tanto admiro. Obrigada por todo o amor e acima de tudo amizade durante esta etapa tão importante na minha vida. Agora percebo que um simples olhar diz muito! Essa tua força move montanhas e mais importante que isso move-me a mim... Obrigada meu amor!

Apesar das desilusões que surgiram e podem vir a surgir, o importante é perceber que ninguém nem nada é perfeito e que se te desiludem é porque já muito fizeram por ti...por isso, eu considero que no final de contas esta foi, é e será uma história com um final feliz!

PARTE DO TRABALHO DESENVOLVIDO AO LONGO DA TESE DE MESTRADO FOI APRESENTADO NAS SEGUINTE REUNIÕES CIENTÍFICAS:

XLIII REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE PORTUGUESA DE FARMACOLOGIA

(Porto, Portugal, 6-8 de Fevereiro de 2013)

Differential Regulation of Chronotropism and Inotropism by ATP in Spontaneously-Beating Isolated Rat Atria

Nogueira-Marques S., Oliveira-Monteiro N., Bragança B., Pereira A.C., Fontes-Sousa A.P. & Correia-de-Sá P.

(Apresentação sob a forma de comunicação oral)

VI ENCONTRO DE JOVENS INVESTIGADORES DA UNIVERSIDADE DO PORTO

(Porto, Portugal, 13-15 de Fevereiro de 2011)

Activation of P2X7 and P2Y₁ Receptors by Adenine Nucleotides Counteract Cardiodepression Induced by Adenosine in Spontaneously-Beating Isolated Rat Atria

Nogueira-Marques S., Oliveira-Monteiro N., Bragança B., Pereira A.C., Fontes-Sousa A.P. & Correia-de-Sá P.

(Apresentação sob a forma de comunicação oral)

RESUMO

As purinas e as pirimidinas extracelulares (e.g. ATP, ADP, UTP e UDP) estão envolvidas na fisiopatologia de várias doenças cardiovasculares. O conhecimento do efeito do ATP (e nucleótidos relacionados) sobre o automatismo cardíaco é limitado, pelo que este estudo visou avaliar o seu papel sobre a atividade cardíaca espontânea.

Os nucleótidos de adenina, ATP e ADP (100 μ M), reduziram transitoriamente a força de contração (Fase I), à qual se seguiu um período de recuperação progressivo (Fase II) que foi mantido até à remoção dos nucleótidos do meio de incubação. O ATP e o ADP (100 μ M) reduziram de forma imediata e sustentada a frequência de contração auricular. A adenosina (ADO, 100 μ M) diminuiu ambos os parâmetros avaliados. O bloqueio seletivo de recetores A_1 (A_1 AR) com DPCPX (100 nM) atenuou as respostas crono- e inotrópicas negativas do ATP, do ADP e da ADO. O inibidor das E-NTPDases, POM-1 (100 μ M), sensibilizou as aurículas à ação inibitória do ATP. O análogo estável do ATP, ATP γ S (100 μ M), exerceu um efeito cronotrópico negativo que foi antagonizado pela DPCPX (100 nM), mas ao contrário do ATP (100 μ M) promoveu um aumento do inotropismo auricular. O antagonista seletivo do recetor P2X4 (P2X4R), 5'-BDBD (10 μ M), atenuou o efeito cronotrópico negativo do ATP e sensibilizou as aurículas à ação inotrópica negativa do nucleótido. A ivermectina (10 μ M), um modulador alostérico dos P2X4R, favoreceu o cronotropismo negativo do ATP de forma dependente do bloqueio pela DPCPX. Os antagonistas seletivos dos recetores P2X7, A-438079 (3 μ M), e P2Y $_1$, MRS2179 (0,3 μ M), aumentaram o efeito inotrópico negativo do ATP e do ADP, respetivamente. O UTP (100 μ M), ao contrário do UDP, aumentou a força de contração na Fase II.

Os resultados sugerem que a ativação de P2X4R pelo ATP e de A_1 AR pela ADO formada endogenamente atuam sinergicamente por um mecanismo ainda desconhecido para reduzir a frequência de contração espontânea das aurículas isoladas de ratazana. O efeito inotrópico negativo da ADO formada a partir dos nucleótidos de adenina é parcialmente contrariado pela ativação de recetores P2X7 e/ou P2Y $_1$ respetivamente pelo ATP e pelo ADP existentes no meio extracelular. Conclui-se, portanto, que existe uma separação molecular entre os mecanismos responsáveis pelos efeitos crono- e inotrópicos dos nucleótidos da adenina e uracilo nas aurículas de ratazana.

PALAVRAS-CHAVE: ATP, ADP, ADO, E-NTPDases, A_1 AR, recetores P2, cronotropismo e inotropismo.

ABSTRACT

Extracellular purines and pyrimidines (e.g. ATP, ADP, UTP e UDP) are involved in the pathophysiology of various cardiovascular diseases. The knowledge about the role of ATP (and related nucleotides) on cardiac automatism is very limited. Therefore, this study was designed to evaluate their role on spontaneous cardiac activity.

The adenine nucleotides, ATP and ADP (100 μ M), exerted a transient reduction in the amplitude of contraction (Phase I), followed by a gradual recovery (Phase II) that remained until washout of the nucleotides. ATP and ADP (100 μ M) consistently decreased the frequency of atrial contractions. Adenosine (ADO, 100 μ M) decreased both the frequency and the force of spontaneous atrial contractions during Phases I and II. The selective blockade of A₁ receptors (A₁AR) with DPCPX (100 nM) attenuated the negative chrono- and inotropic responses of ATP, ADP and ADO. The E-NTPDase inhibitor POM-1 (100 μ M) sensitized atria to negative chrono- and inotropic effects of the nucleotide. The stable ATP analogue, ATP γ S (100 μ M), caused a sustained negative chronotropic effect, which was attenuated by DPCPX. In contrast to ATP, ATP γ S (100 μ M) increased atrial inotropism in Phase II. The P2X₄ receptor (P2X₄R) antagonist, 5'-BDBD (10 μ M), attenuated the negative chronotropic effect of ATP and sensitized atria to the negative inotropic action of the nucleotide. Ivermectin (10 μ M), a P2X₄R positive allosteric modulator, significantly potentiated the negative chronotropism of ATP, an effect that was abolished by DPCPX. Blockade of P2X₇, with A-438079 (3 μ M), and P2Y₁ receptors, with MRS2179 (0.3 μ M), favoured the negative inotropism of ATP and ADP, respectively. UTP (100 μ M), in contrast to UDP (100 μ M), increased the strength of atrial contractions during Phase II.

Data suggest that ATP and its metabolite ADO, respectively via P2X₄R and A₁AR, act synergistically to promote negative chronotropic effect in spontaneously beating rat atria. The A₁-receptor-mediated negative inotropic action of ADO is partially counteracted by ATP and ADP acting through P2X₇ and P2Y₁ receptors. This study also shows that the molecular mechanisms responsible for the chrono- and inotropic effects of adenine and uracil nucleotides in the rat isolated atria are distinct.

KEYWORDS: ATP, ADP, ADO, E-NTPDases, A₁AR, P2 receptors, chronotropism and inotropism.

ÍNDICE

RESUMO	V
ABSTRACT	VI
LISTA DE ABREVIATURAS	IX
LISTA DE FIGURAS	XI
I. INTRODUÇÃO.....	14
1. Anatomia e Fisiologia Cardíaca	14
2. Purinas no Sistema Cardiovascular	17
2.1- Purinas e Pirimidinas.....	18
2.2- Recetores Purinérgicos	19
2.2.1- Recetores Purinérgicos P1	19
2.2.2- Recetores Purinérgicos P2	20
2.2.3- Expressão de Recetores Purinérgicos	22
2.3- Nucleótidos de Adenina	23
2.3.1- Origem dos Nucleótidos de Adenina.....	23
2.3.2- Metabolismo de Nucleótidos de Adenina	26
2.3.3- Papel dos Nucleótidos de Adenina na Função Cardíaca.....	28
2.4- Nucleótidos de Uracilo	32
II. OBJETIVO	34
III. MATERIAL E MÉTODOS	35
1. Animais.....	35
2. Preparações e Condições Experimentais.....	35
3. Protocolos Experimentais	37
4. Materiais e Soluções.....	39
5. Avaliação dos Dados e Análise Estatística.....	40
IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO	42

1. Efeito dos nucleótidos de adenina (ATP e ADP) sobre a contração espontânea de aurículas isoladas de ratazana	42
2. Influência do bloqueio dos recetores A ₁ da adenosina nas respostas contráteis ao ATP, ADP e ADO em aurículas isoladas de ratazana.....	49
3. Papel das ecto-nucleotidases nas respostas contráteis ao ATP em aurículas isoladas de ratazana	51
4. Influência da ativação e do bloqueio de recetores sensíveis ao ATP nas respostas contráteis de aurículas isoladas de ratazana	53
5. Influência do bloqueio do recetor P2Y ₁ nas respostas contráteis ao ADP em aurículas isoladas.....	61
6. Efeito dos nucleótidos de uracilo (UTP e UDP) sobre a contração espontânea de aurículas isoladas de ratazana	64
V. CONCLUSÃO	66
VI. BIBLIOGRAFIA	69
VII. ANEXOS	84

LISTA DE ABREVIATURAS

- 2-meSATP** – 2-metiltioadenosina-5'-trifosfato
- 5'-BDBD** – 5-(3-Bromofenil)-1,3-dihidro-2*H*-benzofuro[3,2-*e*]-1,4-diazepin-2-ona
- A-438079** – 3-[[5-(2,3-Diclorofenil)-1*H*-tetrazol-1-il]metil]piridina
- ABC** – Transportadores *ATP-binding cassette*
- AC** – Ciclase do adenilato
- ACh** – Acetilcolina
- ADN** – Ácido desoxirribonucleico
- ADO; AR; A_xAR** – Adenosina; Recetor da adenosina; Recetor da adenosina A₁, A_{2A}, A_{2B} e A₃
- ADP** – 5'-Difosfato de adenosina
- α,β-meATP** – α,β-metilenoadenosina-5'-trifosfato
- AMP** – 5'-Monofosfato de adenosina
- AMPc** – 5'-Monofosfato de adenosina cíclico
- ARL67156** – 6-*N,N*-dietil-D-β,γ-dibromometilenoATP
- ARN** – Ácido ribonucleico
- ARNm** – Ácido ribonucleico mensageiro
- ATP** – 5'-Trifosfato de adenosina
- ATPyS** – 5'-(γ-Tio)trifosfato de adenosina
- β₁R** – Receptor β₁-adrenérgico
- Ca²⁺** – Ião cálcio
- Ca_v1 (tipo L)** – Canais de cálcio sensíveis à voltagem do tipo L
- CD39 / apirase / ATPDase** – 5'-Trifosfato de adenosina difosfohidrolase
- CD39L1 / ATPase** – 5'-Trifosfatase de adenosina
- CD73** – Ecto-5'-nucleotidase
- DAG** – Diacilglicerol
- DPCPX** – 1,3-Dipropil-8-ciclopentilxantina
- GIRK (ou KIR 3.1 / 3.4)** – *G protein-gated inwardly rectifying K channels*
- IP₃** – Inositol 1,4,5-trifosfato
- K⁺** – Ião potássio
- M₂R** – Receptores muscarínicos do subtipo M₂
- MRS2179** – 2'-deoxy-*N*⁶-metiladenosina 3',5'-bifosfato
- NA** – Noradrenalina
- Na⁺** – Ião sódio
- Nó AV** – Nó aurículo-ventricular

Nó SA – Nó sinusal

P2X(x)R; P2Y_(x)R – Recetores purinérgicos P2X(1-7); Recetores purinérgicos

P2Y_(1,2,4,6,11,12,13,14)

PKA – Proteína cinase A

PKC – Proteína cinase C

PLC – Fosfolipase C

POM-1 – Polioxometalato 1

PPADS – Piridoxal fosfato-6-azo(ácido benzeno-2,4-dissulfónico)

Proteínas G; G_i / G_s – Proteínas ligadas a nucleótidos de guanina; Proteínas G de carácter inibitório / estimulatório

PSVT – Taquicardias Supraventriculares Paroxísticas

PTX – Toxina *pertussis*

RB2 – *Reactive blue 2*

R-PIA – (R)-N⁶-(1-metil-2-feniletil)adenosina

SNA – Sistema nervoso autónomo

E-NTPDase – Ecto-nucleósido trifosfato difosfo-hidrolases

UDP – 5'-Difosfato de uridina

UDPβS – 5'-O-tiodifosfato de uridina

UMP – 5'-Monofosfato de uridina

UTP – 5'-Trifosfato de uridina

UTPyS – 5'-O-3-tiotrifosfato de uridina

Verapamil – α-[3-[[2-(3,4-Dimetoxifenil)etil]metilamino]propil]-3,4-dimetoxi-α-(1-metiletil)benzenoacetonitrilo

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1 – Representação esquemática de um corte longitudinal do coração.	15
Fig. 2 – Representação esquemática da regulação nervosa do coração	16
Fig. 3 – Representação esquemática das vias de sinalização associadas aos recetores purinérgicos P1.....	20
Fig. 4 – Representação esquemática das vias de sinalização associadas aos recetores purinérgicos P2.....	21
Fig. 5 – Representação esquemática das vias de libertação de nucleótidos	24
Fig. 6 – Biossíntese e catabolismo dos nucleótidos de adenina.	27
Fig. 7 – Animais e preparação experimental.....	35
Fig. 8 – Representação exemplificativa do <i>set-up</i> de contração onde são realizados os estudos miográficos após montagem das aurículas isoladas no banho de órgãos.	36
Fig. 9 – Representação esquemática simplificada do procedimento experimental nas experiências de contração espontânea de aurículas isoladas de ratazana.....	38
Fig. 10 – Representação exemplificativa das contrações isométricas em aurículas a contrair espontânea e ritmicamente	40
Fig. 11 – Esquema representativo da forma de cálculo do efeito inotrópico negativo (Fase I) e do efeito inotrópico positivo (Fase II) do ATP (aplicável aos restantes agonistas estudados que apresentaram um efeito bifásico semelhante).....	41
Fig. 12 – Representação do traçado original exemplificativo do efeito cronotrópico e inotrópico diferencial do ATP (100 μ M) em aurículas isoladas de ratazana a contrair espontaneamente.	42
Fig. 13 – A) Representação dos traçados originais usados para a quantificação dos parâmetros avaliados (assinalado com Fase I e Fase II) durante as contrações isométricas do músculo auricular de ratazana em resposta à aplicação do ATP. B) Representação gráfica do efeito do ATP (100 μ M) sobre a frequência e a força de contração das aurículas isoladas de ratazana a contrair espontaneamente durante a Fase I e a Fase II.....	43

Fig. 14 – Representação gráfica do efeito do ADP (100 μ M) sobre a frequência e a força de contração das aurículas isoladas de ratazana a contrair espontaneamente durante a Fase I e a Fase II	46
Fig. 15 – Representação gráfica do efeito da ADO (100 μ M) sobre a frequência e a força de contração das aurículas isoladas de ratazana a contrair espontaneamente durante a Fase I e a Fase II	47
Fig. 16 – Representação gráfica do efeito do ATP, ADP e ADO (100 μ M) sobre a frequência e a força de contração das aurículas isoladas de ratazana a contrair espontaneamente durante a Fase I e a Fase II, na ausência e na presença de DPCPX (100 nM)	50
Fig. 17 – Representação gráfica do efeito do ATP (100 μ M) sobre a frequência e a força de contração das aurículas isoladas de ratazana a contrair espontaneamente durante a Fase I e a Fase II, na ausência e na presença de POM-1 (100 μ M)	53
Fig. 18 – Representação gráfica do efeito do α,β -meATP (100 μ M) sobre a frequência e a força de contração das aurículas isoladas de ratazana a contrair espontaneamente durante a Fase I e a Fase II	54
Fig. 19 – Representação gráfica do efeito do ATP γ S (100 μ M) sobre a frequência e a força de contração das aurículas isoladas de ratazana a contrair espontaneamente durante a Fase I e a Fase II	55
Fig. 20 – Representação gráfica do efeito do ATP (100 μ M) sobre a frequência e a força de contração das aurículas isoladas de ratazana a contrair espontaneamente durante a Fase I e a Fase II, na ausência e na presença de PPADS (10 μ M), suramina (10 μ M), A-438079 (3 μ M) ou de 5'-BDBD (10 μ M).....	57
Fig. 21 – Representação gráfica do efeito do ATP (100 μ M) sobre a frequência e a força de contração das aurículas isoladas de ratazana a contrair espontaneamente durante a Fase I e a Fase II, na ausência e na presença de ivermectina (10 μ M) e ivermectina (10 μ M) + DPCPX (100 nM).....	59
Fig. 22 – Representação gráfica do efeito do ATP γ S (100 μ M) sobre a frequência e a força de contração das aurículas isoladas de ratazana a contrair espontaneamente durante a Fase I e a Fase II, na ausência e na presença de DPCPX (100 nM)	60
Fig. 23 – Representação gráfica do efeito do ADP (100 μ M) sobre a frequência e a força de contração das aurículas isoladas de ratazana a contrair espontaneamente	

durante a Fase I e a Fase II, na ausência e na presença de MRS2179 (0,3 μ M) e de MRS2179 (0,3 μ M) + DPCPX (100 nM) **63**

Fig. 24 – Representação gráfica do efeito do UTP e UDP (100 μ M) (A e B, respetivamente) sobre a frequência e a força de contração das aurículas isoladas de ratazana a contrair espontaneamente durante a Fase I e a Fase II **65**

Fig. 25 – Representação esquemática do mecanismo hipotético responsável pelo efeito cronotrópico negativo monofásico e pelo efeito inotrópico bifásico do ATP em aurículas isoladas de ratazana a contrair espontaneamente..... **68**

Fig. 26 – Representação esquemática global da ação dos nucleótidos de adenina e uracilo e dos restantes fármacos usados (agonistas, antagonistas e inibidores) sobre os recetores purinérgicos P1 e P2 e sobre as enzimas responsáveis pela metabolização dos nucleótidos de adenina..... **84**

I. INTRODUÇÃO

1. Anatomia e Fisiologia Cardíaca

O coração é o órgão central do sistema cardiovascular e tem como principal função bombear o sangue para todo o organismo. Anatomicamente, o coração é constituído por duas cavidades superiores de paredes relativamente finas (aurículas direita e esquerda) e por duas cavidades inferiores de paredes mais espessas (ventrículos direito e esquerdo) (laizzo, 2009) (Figura 1). As aurículas recebem o sangue da circulação sistémica ou dos pulmões e enviam-no para os ventrículos, que por sua vez impulsionam o mesmo através da circulação pulmonar (pelo ventrículo direito) ou da circulação periférica (pelo ventrículo esquerdo) (Scanlon, 2007).

O coração é um músculo especializado, diferente do músculo esquelético, capaz de sustentar o batimento contínuo. A sequência dos eventos cardíacos que ocorrem desde o início de um batimento cardíaco até o início do próximo é, no seu conjunto, designada de ciclo cardíaco. Para que tal fenómeno ocorra, a capacidade de bombeamento do coração requer uma coordenação precisa das células miocárdicas. Estas, dispostas em série e em paralelo entre si, contêm miofibrilas contráteis, nomeadamente filamentos de actina e de miosina, imprescindíveis no despoletar da contração. A contração de cada célula é acionada através de impulsos elétricos excitatórios gerados em fibras especializadas (fibras musculares excitatórias e condutoras especializadas), sendo transmitidos ao restante miocárdio sob a forma de potenciais de ação. A geração espontânea destas correntes iónicas é responsável pela ritmicidade cardíaca (Hall, 2006), um processo espontâneo iniciado pelas células marcapasso (Golan, 2012). Estas células especializadas possuem, assim, capacidade de se autodespolarizarem acima de um dado limiar de excitabilidade de uma forma rítmica (exibindo automatismo); localizam-se no nó sinusal (SA), nó aurículo-ventricular (AV) e sistema de condução ventricular (feixe de His e fibras de Purkinje) (Ganong, 2003; Van De Graaff, 2013) (Figura 1). Cada ciclo é iniciado pela geração espontânea de um potencial de ação no nó SA, localizado na parede lateral superior da aurícula direita, perto da abertura da veia cava superior (Guyton, 2006; Scanlon, 2007) (Figura 1). A transmissão de impulsos a partir do nó SA para o nó AV e para o resto do miocárdio auricular gera a sístole auricular. O feixe de His recebe impulsos a partir do nó AV e transmite-os para os seus ramos direito e esquerdo. Estes viajam ao longo das fibras de Purkinje para o resto do miocárdio ventricular perfazendo a sístole ventricular (Armstrong & Clapham, 2008) (Figura 1). O ciclo cardíaco é, portanto,

comandado pela geração e transmissão dos impulsos elétricos através do miocárdio, causando situações de sincronia / dessincronia auriculares e ventriculares, que são em última análise as responsáveis pela fase de relaxamento (diástole) sucedida por uma fase de contração (sístole) de forma coordenada para que o sangue no interior do coração seja impulsionado das veias que o recebem para as artérias que o evacuam (Van De Graaff, 2013). Em suma verifica-se que o ciclo cardíaco é, então, uma sequência de eventos mecânicos, regulada pela atividade elétrica do miocárdio (Scanlon, 2007).

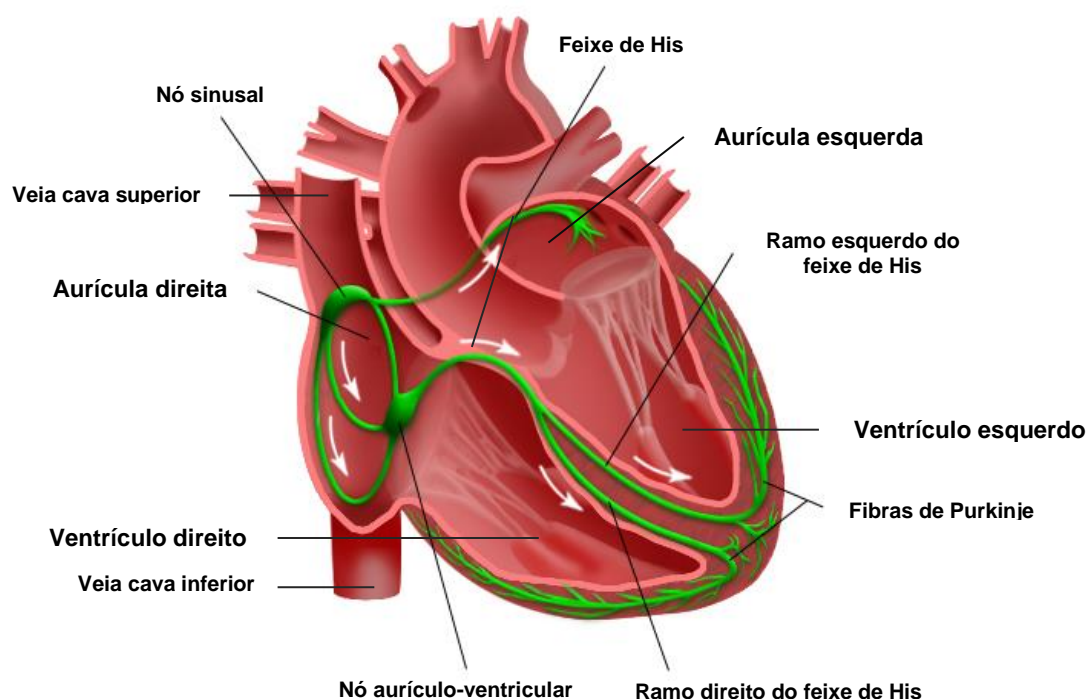


Fig. 1 – Representação esquemática de um corte longitudinal do coração, evidenciando as suas cavidades anatômicas superiores (aurícula direita e esquerda) e inferiores (ventrículo direito e esquerdo) e o sistema de condução elétrico intrínseco cardíaco a verde (nó sinusal, nó aurículo-ventricular, feixe de His e respetivos ramos esquerdo e direito e fibras de Purkinje). As setas indicam o sentido pelo qual ocorre a condução elétrica no tecido cardíaco (Adaptado de Jiang & Mangharam, 2013).

Em condições fisiológicas são as células do nó SA que determinam o ritmo de contração cardíaco, uma vez que a velocidade de geração dos impulsos elétricos destas células supera a velocidade das restantes células. Juntas, as células marcapasso compõem o sistema de condução cardíaco (Figura 1). Além disso, o músculo cardíaco é composto por um segundo tipo de células especializadas, as células não marcapasso. Estas incluem os miócitos auriculares e ventriculares que contraem em resposta à despolarização e são responsáveis pela maior parte da contração cardíaca (Guyton, 2006; Armstrong & Clapham, 2008).

Embora o coração seja capaz de gerar e manter o seu próprio batimento (automatismo cardíaco), a sua atividade pode ser alterada como resultado da adaptação a diferentes situações e controlada por intermédio dos nervos cardíacos (Figura 2) e das hormonas circulantes. O sistema nervoso autónomo (SNA) modula a frequência cardíaca, bem como a força de contração (Scanlon, 2007). Assim, para além do coração estar sob a influência de uma rede neuronal intrínseca (intracardíaca) (Figura 1), está também sob o controle de um rico suplemento de fibras nervosas aferentes e eferentes (simpática e parassimpática) do SNA (Ter Horst, 2000) (Figura 2).

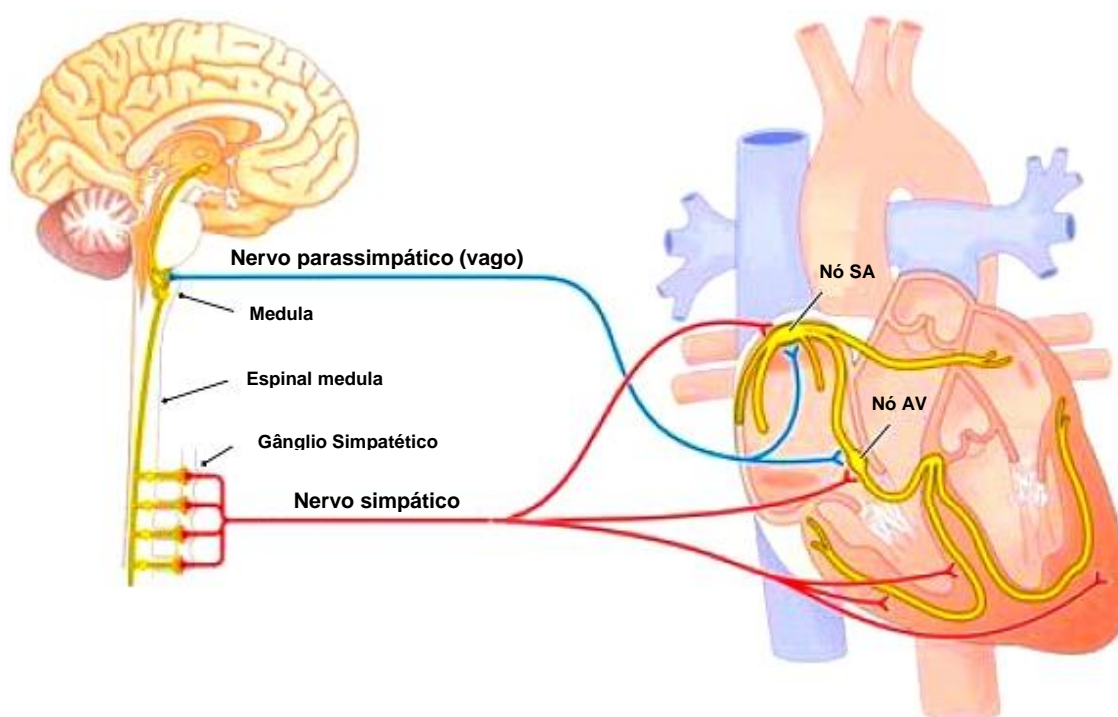


Fig. 2 – Representação esquemática da regulação nervosa do coração, evidenciando a interação entre o sistema nervoso intrínseco autónomo e o músculo cardíaco. Os nervos parassimpáticos (representados a azul) e os nervos simpáticos (representados a vermelho) regulam o sistema de condução elétrico cardíaco (representado a amarelo). Por consequência, o sistema nervoso autónomo influencia a frequência e a força de contração (Adaptado de Scanlon, 2007).

O sistema nervoso intrínseco interatua com a inervação eferente de uma forma complexa, auxiliando na manutenção do débito cardíaco (Ter Horst, 2000). A estimulação dos terminais nervosos parassimpáticos, veiculada pelo nervo vago, promove um efeito cardiodepressor (Olshansky *et al.*, 2008), tendo como neurotransmissor a acetilcolina (ACh) que atua nos recetores muscarínicos do subtipo M_2 (M_2R) (Ter Horst, 2000). Por outro lado, a estimulação simpática, por via da noradrenalina (NA), atuando principalmente nos recetores β_1 -adrenérgicos (β_1R), desencadeia no tecido cardíaco um aumento da frequência de geração de impulsos (cronotropismo positivo), da velocidade de condução (dromotropismo positivo), da

contractilidade (inotropismo positivo) e da dilatação das artérias coronárias permitindo ao coração responder às necessidades metabólicas do organismo (Ter Horst, 2000). Assim, em condições fisiológicas, o controlo da geração de estímulos pelas células do tecido cardíaco é alcançado pelo equilíbrio estabelecido entre a estimulação do SNA simpático e parassimpático, via recetores adrenérgicos e muscarínicos, respetivamente (Brodde, 1999). A regulação da atividade “marcapasso” pode também ser modulada por outros mecanismos não-neuronais, como por exemplo: catecolaminas em circulação, alteração das concentrações iónicas plasmáticas, hipóxia e fármacos (Klabunde, 2005).

2. Purinas no Sistema Cardiovascular

Nas últimas décadas tem-se assistido a um progresso significativo no desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento de várias doenças cardiovasculares. Apesar deste esforço, estas doenças são ainda responsáveis por aproximadamente metade (~50%) dos casos de morte prematura na maioria dos países (Szentmiklosi *et al.*, 2011). Torna-se, assim, premente prosseguir a pesquisa de forma a encontrar novas ferramentas farmacológicas, sendo para isso fundamental definir novos alvos moleculares. Uma vez que as purinas como o 5'-trifosfato de adenosina (ATP) e os seus metabolitos estão envolvidos na fisiopatologia de numerosas doenças cardiovasculares (e.g. isquemia-reperfusão, arritmias e hipertensão), fármacos que controlem a atividade de recetores para estas moléculas podem ser a chave para o sucesso no combate à mortalidade provocada por estas doenças.

O estudo clássico de Drury e Szent-Györgyi, em 1929, estabeleceu que o ATP e seus derivados poderiam exercer efeitos cardíacos relevantes (Drury & Szent-Gyorgyi, 1929). Estes autores observaram que a adenosina (ADO), metabolito resultante do ATP, provocava um bloqueio cardíaco temporário, quando da injeção de extratos de tecidos cardíacos, por via intravenosa, num animal inteiro. Assim, descreveram os nucleótidos e nucleósidos de purina como sendo capazes de exercer efeitos proeminentes no sistema cardiovascular (Eltzschig, 2009; Burnstock *et al.*, 2010). Desde então, inúmeros estudos foram efetuados no sentido de caracterizar o papel dos nucleótidos e nucleósidos de purina no músculo cardíaco.

Há quase 30 anos foi publicada a primeira revisão abrangente sobre os efeitos eletrofisiológicos do ATP e da ADO no músculo cardíaco (Belhassen & Pelleg, 1984). Naquela época, pouco se sabia sobre o mecanismo de ação destes dois compostos endógenos ubíquos, o que era bastante surpreendente, considerando o uso

extensivo do ATP como fármaco de eleição para o tratamento agudo de taquicardias supraventriculares paroxísticas (PSVT). Atualmente, a ADO administrada por via endovenosa é amplamente usada na prática clínica, nomeadamente como primeira linha de tratamento na conversão imediata de PSVT, assim como agente de controlo da frequência ventricular na fibrilhação auricular (Belhassen & Pelleg, 1984; Mustafa *et al.*, 2009). A sua rápida eficácia, reduzido tempo de semi-vida e menor efeito hipotensor quando comparado com outros fármacos recomendados, como os bloqueadores de canais de cálcio (Ca^{2+}) sensíveis à voltagem do tipo L [Ca_v1 (tipo L)], caso do verapamil, justificam o uso da ADO como um fármaco anti-disrítico (Blomstrom-Lundqvist *et al.*, 2003).

Na literatura são inúmeros os dados acerca da ação das purinas, como o ATP e o 5'-difosfato de adenosina (ADP), e das pirimidinas, como o 5'-trifosfato de uridina (UTP) e o 5'-difosfato de uridina (UDP), nos processos biológicos, tais como na função cardíaca, fluxo sanguíneo e distribuição de oxigénio, na neurotransmissão do sistema nervoso central e nas respostas inflamatórias (Yegutkin, 2008).

2.1 - Purinas e Pirimidinas

Os nucleótidos são moléculas essenciais, derivadas das glicosaminas, que desempenham um importante papel nos processos biológicos. Estão envolvidos na transmissão genética e no armazenamento e recuperação da informação biológica, pois são as unidades básicas dos ácidos nucleicos (Metzler, 2001; Alberts *et al.*, 2004). Cada nucleótido é constituído por três partes essenciais: uma pentose (açúcar com cinco carbonos), uma base azotada e um grupo fosfato. Estas bases, constituintes dos ácidos nucleicos, são compostos aromáticos heterocíclicos hidrofóbicos que derivam de pirimidinas, se contêm um anel de 6 átomos, ou de purinas, se contêm dois anéis fundidos de 5 e 6 átomos de carbono e azoto (Murray, 2003; Koolman, 2005). As bases mais comuns são a adenina, a guanina (purinas) e a citosina (pirimidina); estas são constituintes do ácido desoxirribonucleico (ADN) e do ácido ribonucleico (ARN), os principais ácidos nucleicos. A base timina (pirimidina) é encontrada apenas no ADN, enquanto o uracilo (pirimidina) só pode ser encontrado no ARN (Lodish, 2004).

Há um interesse crescente sobre os efeitos dos nucleótidos de adenina e uracilo no sistema cardiovascular. Os efeitos cardíacos das purinas, tais como o ATP, o ADP e a ADO, têm sido extensivamente estudados desde os primeiros resultados funcionais. No entanto, poucos são os estudos que se têm centrado sobre o efeito de pirimidinas, tais como, o UTP e o UDP, no coração. Os nucleótidos de adenina e

uracilo são importantes moléculas sinalizadoras que medeiam os seus efeitos pela ativação de recetores específicos na superfície celular dos miócitos cardíacos, os recetores purinérgicos, recetores sensíveis a purinas e a pirimidinas (Fredholm *et al.*, 1997; Burnstock, 2004).

2.2 - Recetores Purinérgicos

Em 1970 foi proposto o ATP como molécula sinalizadora que poderia atuar como neurotransmissor convencional para iniciar efeitos biológicos potentes (Burnstock *et al.*, 1970). Implícita a esta ideia foi a presença de purinorecetores, que levou Burnstock (1978) a sugerir que os efeitos biológicos dos nucleótidos de adenina e ADO são mediados por recetores purinérgicos (Burnstock, 1978). Com base em estudos de clonagem molecular, um determinado número destes recetores são agora reconhecidos. Estes estão divididos em dois grandes grupos: recetores purinérgicos P1 e recetores purinérgicos P2 (Burnstock & Meghji, 1981).

2.2.1 - Recetores Purinérgicos P1

Os recetores P1 são sensíveis à ADO (Van Calker *et al.*, 1979), o produto resultante da metabolização do ATP, e são bloqueados por metilxantinas; são conhecidos estrutural, funcional e farmacologicamente 4 subtipos de recetores P1: A₁, A_{2A}, A_{2B} e A₃ (A₁AR, A_{2A}AR, A_{2B}AR, A₃AR) (Burnstock, 2007) (Figura 3). A caracterização destes subtipos é baseada no seu perfil farmacológico específico, acoplamento a membros de famílias de proteínas ligadas a nucleótidos de guanina (proteínas G) e mecanismos de sinalização envolvendo a ativação específica do subtipo de recetores de adenosina (AR) (Fredholm *et al.*, 2001). Estruturalmente, os AR identificados até ao momento apresentam-se sob a forma de proteínas com sete domínios transmembranares (Jacobson *et al.*, 1992) (Figura 3). Estes recetores metabotrópicos modulam respostas celulares através de mecanismos de transdução de sinal associados a três proteínas G intracelulares: proteína G de carácter estimulatório (G_s), proteína G de carácter inibitório (G_i) e proteína G_{q/11} (Dzimiri, 2002). A sinalização dos AR ocorre mediante alterações na atividade da ciclase do adenilato (AC), resultando em alterações subsequentes dos níveis de 5'-monofosfato de adenosina cíclico (AMPc) intracelular como segundo mensageiro (Fredholm, 2007). A ativação dos A₁AR e A₃AR resulta na redução da produção de AMPc, por via da inibição da atividade da AC, através do acoplamento à proteína G_i (Figura 3). A ativação destes recetores estimula ainda a atividade da fosfolipase C (PLC), por

intermédio do acoplamento à proteína $G_{q/11}$, com um consequente aumento na produção de inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3) e diacilglicerol (DAG) (Szentmiklosi *et al.*, 2011), responsável pela ativação da proteína cinase C (PKC) (Figura 3). Pelo contrário, a ativação dos A_{2A} AR e A_{2B} AR é capaz de estimular a enzima AC por intermédio de proteínas G_s e, portanto, provocar um aumento de AMPc (Szentmiklosi *et al.*, 2011) (Figura 3). Adicionalmente, o A_{2B} AR também se encontra acoplado à proteína $G_{q/11}$ levando, portanto, a uma posterior ativação da PLC e consequente aumento de IP_3 e Ca^{2+} (Szentmiklosi *et al.*, 2011) (Figura 3). É ainda importante referir que o A_1 AR está acoplado a canais específicos de potássio (K^+), através da interação das subunidades $\beta\gamma$ de proteínas G_i (*G protein-gated inwardly rectifying K channels*, GIRK ou KIR3.1/3.4). Nos pequenos roedores, a ADO liga-se com maior afinidade aos A_1 AR e A_{2A} AR (valores de K_i de 10-30 nM), tendo uma afinidade intermédia para os A_3 AR (1 μ M, na ratazana) e uma menor afinidade para o A_{2B} AR ($K_i > 1 \mu$ M) (Jacobson, 2009).

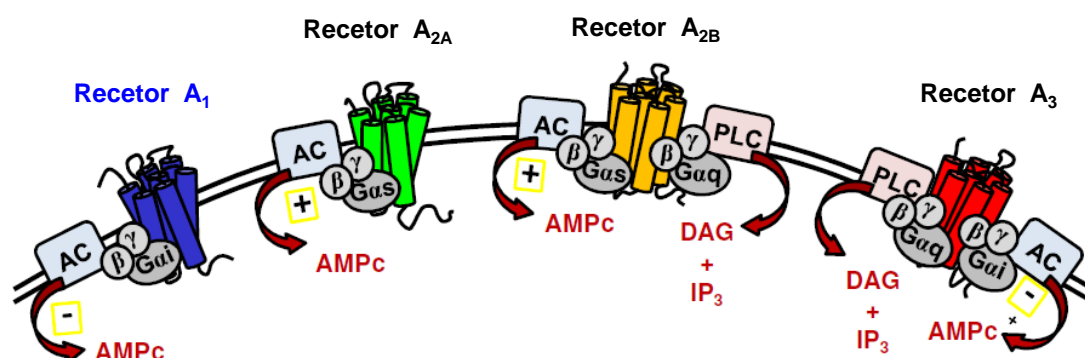


Fig. 3 – Representação esquemática das vias de sinalização associadas aos recetores purinérgicos P1. A ativação dos A_1 AR e A_3 AR normalmente inibe a atividade da AC através da ativação de proteínas G_i , diminuindo os níveis AMPc intracelulares. A ativação dos A_{2A} AR e A_{2B} AR geralmente aumenta a atividade da AC através da ativação de proteínas G_s , com consequente aumento da concentração de AMPc intracelular. A ativação da PLC induzida pelos A_{2B} AR e dos A_3 AR ocorre através de proteínas G_q , conduzindo a um aumento intracelular de DAG e IP_3 (Adaptado de Duarte-Araújo, 2011).

2.2.2 - Recetores Purinérgicos P2

Os recetores P2 medeiam as ações extracelulares dos nucleótidos de adenina e uracilo (ATP, ADP, UTP, UDP) e estão distribuídos pelo organismo de forma generalizada, participando na regulação de praticamente todos os processos fisiológicos (Surprenant & North, 2009). Estes recetores englobam duas famílias distintas, os recetores P2X (P2XR) ionotrópicos e os recetores P2Y (P2YR) metabotrópicos (Fredholm *et al.*, 1994; Burnstock, 2004). Os P2XR subdividem-se em 7 subtipos (1-7); tratam-se de canais iónicos intrínsecos ativados por ligando de ação

rápida capazes de alterar a permeabilidade da membrana celular a catiões pequenos, tais como o sódio (Na^+), o K^+ e o Ca^{2+} , levando à despolarização celular e a elevações transitórias do Ca^{2+} livre citosólico (Bean, 1992) (Figura 4).

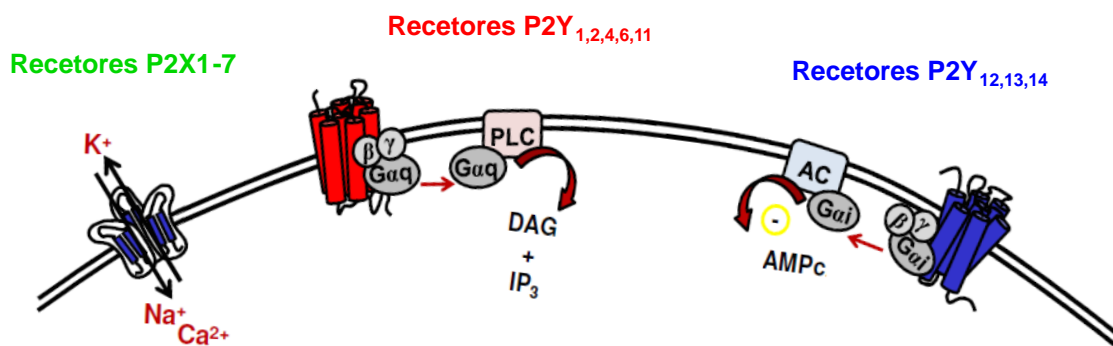


Fig. 4 – Representação esquemática das vias de sinalização associadas aos receptores purinérgicos P2. Os P2XR são ionotrópicos e a sua ativação abre uma conduta catiónica, resultando na hiperpolarização celular via efluxo de K^+ e influxo de Na^+ e Ca^{2+} extracelular. Os receptores P2Y_{1,2,4,6,11} são receptores acoplados a proteína G e a sua ativação, através de proteínas G_q, conduz à ativação da PLC gerando DAG e IP₃, e um consequente aumento de Ca^{2+} citosólico a partir das reservas intracelulares. A ativação dos receptores P2Y_{12,13,14}, também receptores metabotrópicos, inibe a atividade da AC através da ativação de proteínas G_i, diminuindo os níveis AMPc intracelulares (Adaptado de Duarte-Araújo, 2011).

Por seu turno, os P2YR são subdivididos em 8 subtipos (1, 2, 4, 6, 11, 12, 13 e 14) e são todos acoplados a proteínas G (Burnstock & Kennedy, 1985; Burnstock, 1996; von Kugelgen & Wetter, 2000). A família de P2YR é subdividida em dois grupos estruturalmente distintos. O primeiro grupo, composto pelos subtipos P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆ e P2Y₁₁ (P2Y₁R, P2Y₂R, P2Y₄R, P2Y₆R e P2Y₁₁R, respetivamente), acopla a proteínas G_q e estimula a PLC, seguida de aumentos nos fosfatos de inositol intracelulares bem como na mobilização das reservas de Ca^{2+} intracelulares (Figura 4). Adicionalmente, o recetor do subtipo P2Y₁₁ pode ainda estar acoplado a proteínas G_s, podendo induzir um aumento na atividade da AC (O'Connor *et al.*, 1991; Nicholas *et al.*, 1996a; Communi *et al.*, 1997) (Figura 4). Os membros do segundo grupo, os receptores P2Y₁₂, P2Y₁₃ e P2Y₁₄ (P2Y₁₂R, P2Y₁₃R e P2Y₁₄R, respetivamente) estão acoplados a proteínas G_i, levando à inibição da AC e consequentemente à diminuição intracelular dos níveis de AMPc (von Kugelgen, 2006; Erlinge & Burnstock, 2008; Koles *et al.*, 2008) (Figura 4).

Os P2XR são mais restritos estruturalmente do que os P2YR em termos de seletividade para o agonista. De facto, os P2XR são ativados exclusivamente pelo ATP, enquanto os P2YR podem ser ativados por vários nucleótidos extracelulares (e.g. ATP, ADP, UTP e UDP) (Robson *et al.*, 2006). O UTP, UDP e UDP-glucose ativam pelo menos quatro subtipos de P2YR: P2Y₂, 4, 6, 14 (Ralevic & Burnstock, 1998).

O UTP é um agonista de P2Y₂R (Nicholas *et al.*, 1996b) e P2Y₄R (Communi *et al.*, 1996a). O P2Y₆R é ativado pelo UDP (Communi *et al.*, 1996b; Nicholas *et al.*, 1996b) e o UDP-glucose ativa P2Y₁₄R (Freeman *et al.*, 2001). O P2Y₂R é ativado tanto por UTP como por ATP. Estes purinoreceptores P2 também são subdivididos com base na ordem de potência de análogos do ATP (Burnstock & Kennedy, 1985). O P2XR é ativado mediante a seguinte ordem de potência: α,β -metilenoadenosina-5'-trifosfato (α,β -meATP) > ATP > 2-metiltioadenosina-5'-trifosfato (2-meSATP), enquanto o P2YR é ativado segundo uma ordem de potência inversa (Burnstock & Kennedy, 1985). No entanto, elucidar os papéis desempenhados pelos membros da família P2X e P2Y tem sido complicado pela carência de ferramentas farmacológicas. Além disso, existe uma dificuldade adicional com a descoberta de que os P2XR podem interagir para formar complexos heteroméricos com perfis farmacológicos e funcionais distintos quando comparadas com as suas subunidades homoméricas (Koles *et al.*, 2008). Da mesma forma, os subtipos de P2YR podem formar homo- ou hetero-oligómeros uns com os outros ou com os AR (Koles *et al.*, 2008).

2.2.3 - Expressão de Recetores Purinérgicos

Os recetores dos nucleótidos de adenina e uracilo são expressos de forma ubiquitária nos sistemas nervoso central e periférico, imunitário, inflamatório, cardiovascular e muscular. Muitos destes subtipos de recetores têm sido encontrados no coração (Vassort, 2001). Uma descrição detalhada da distribuição de recetores purinérgicos nas diferentes regiões do coração deve facilitar uma melhor compreensão da função cardíaca destes recetores.

Os diferentes subtipos de AR encontram-se expressos em diferentes tipos de células (incluindo neurónios intra- e extracardíacos, cardiomiócitos, fibroblastos, células do músculo liso vascular e células endoteliais), embora haja uma expressão diferencial entre os diversos tipos celulares existentes no coração, podendo também variar entre as diferentes espécies animais (Jacobson, 2009). Os A₁AR estão predominantemente localizados nos cardiomiócitos enquanto os A_{2A}AR e A_{2B}AR estão localizados abundantemente no endotélio e músculo liso vascular, encontrando-se com baixa densidade nos cardiomiócitos (Mustafa *et al.*, 2009).

Relativamente aos membros das duas famílias de recetores P2, P2X e P2Y, estes estão abundantemente expressos no coração (Bogdanov *et al.*, 1998; Vassort, 2001). Vários membros da família de P2YR como P2Y_{1, 2, 4, 6} são encontrados nos tecidos cardíacos e são acoplados à PLC pela via da proteína G_q (Morris *et al.*, 1990; Filtz *et al.*, 1994). Um estudo recente, onde analisaram o perfil de expressão dos

recetores P2 no nó SA e no músculo cardíaco, demonstrou a existência de uma distribuição diferencial dos recetores P2 nas várias regiões do coração de ratazana e humano. Por exemplo, o P2X5R foi o P2XR mais abundante em todas as regiões do coração de ratazana (e.g. ventrículo esquerdo, aurícula direita e nó SA), seguindo-se o P2X7R, enquanto os recetores P2Y₂ e P2Y₁₄ foram os P2YR que apresentaram níveis mais elevados de ARNm na aurícula direita e nó SA, respetivamente (Musa *et al.*, 2009). Para além disso, foram observadas diferenças importantes na distribuição dos recetores P2 entre coração de ratazana e humano.

Resta, contudo, relacionar os níveis de expressão génica (maioria dos trabalhos anteriores) com a localização de recetores funcionais na membrana plasmática, onde estes exercem primariamente o seu papel.

2.3 - Nucleótidos de Adenina

Os nucleótidos de adenina desempenham um papel importante nos sistemas biológicos, modulando a função gastrointestinal e hepática, auxiliando a regulação das respostas de células epiteliais e o crescimento e proliferação celular, a indução de apoptose, a formação de placas ateroscleróticas e a reabsorção óssea (Vassort, 2001; Yegutkin, 2008). Assiste-se atualmente a um crescente interesse em torno dos efeitos da ativação dos recetores P2 pelo ATP e os seus derivados no sistema cardiovascular. Estes existem de forma ubiquitária dentro e / ou fora de todas as células vivas, desempenhando múltiplos papéis fisiológicos, de modo a manter a homeostasia das mesmas. O ATP intracelular desempenha um papel crítico bem estabelecido no metabolismo celular e energético e o ATP extracelular atua como um regulador fisiológico local, onde os seus efeitos são mediados por recetores na superfície celular.

2.3.1 - Origem dos Nucleótidos de Adenina

O ATP é o composto energético mais importante das células vivas; em média, em cada dia, o corpo humano produz e metaboliza o ATP no valor igual ao seu peso. Este nucleótido é formado por uma cadeia de três resíduos de fosfato ligados ao grupo 5'-OH do nucleósido de ADO. A nível cardiovascular, os nucleótidos de adenina, sob a forma de ATP, consistem na principal fonte de energia do trabalho cardíaco (Ingwall, 2007). Porém, independentemente das condições a que o músculo esteja sujeito, as suas concentrações são controladas de forma estreita, garantindo assim a regulação do organismo. Em 1963, Berne propôs que a ADO era um regulador fisiológico do

fluxo sanguíneo coronário, estabelecendo uma interligação entre a função miocárdica e as necessidades energéticas (Berne, 1963).

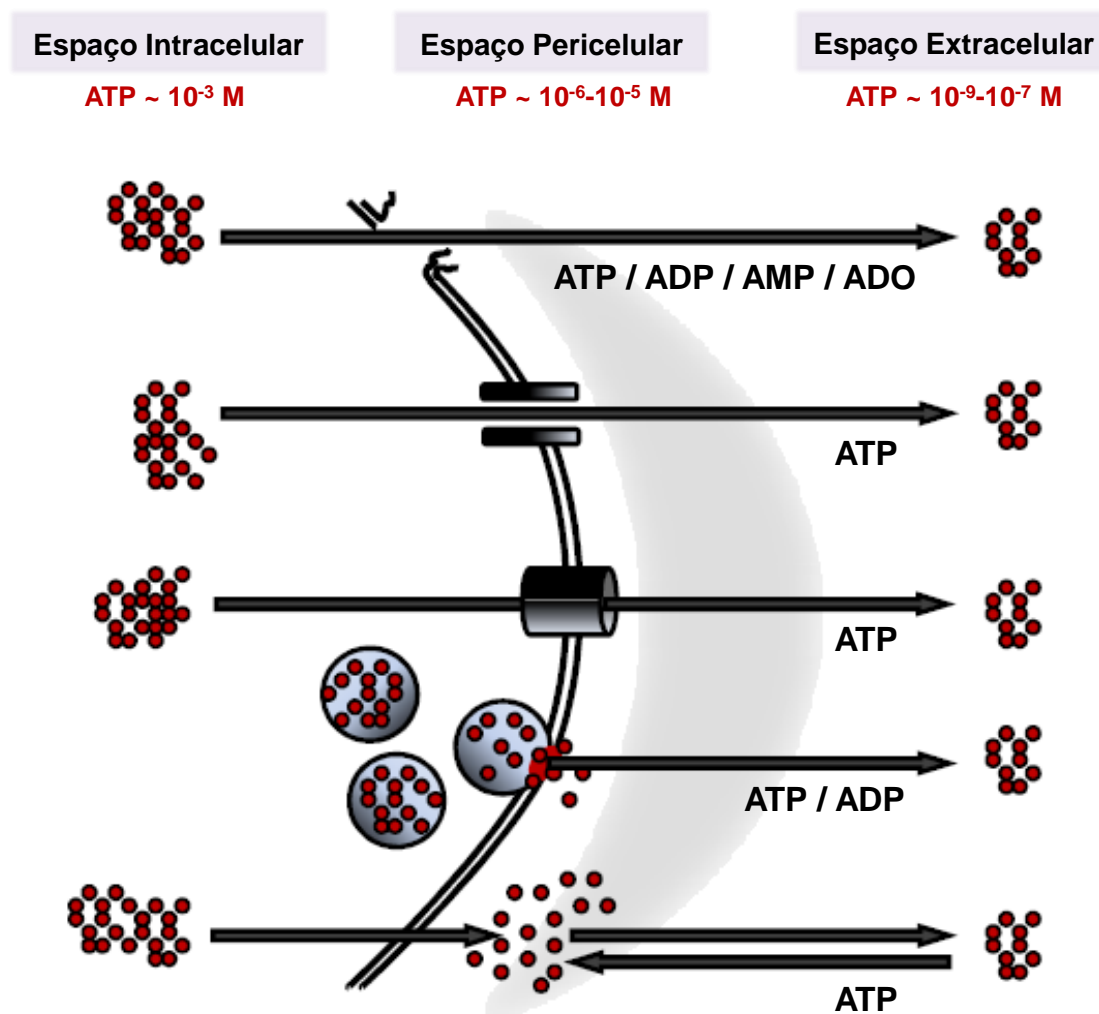


Fig. 5 – Representação esquemática das vias de liberação de nucleótidos. Juntamente com o enorme vazamento de nucleótidos em resposta à lesão celular, os nucleótidos podem aparecer no meio extracelular através de diversas vias não líticas, incluindo: movimento eletrodifusional através de canais de liberação de ATP; difusão facilitada por transportadores específicos de nucleótidos; exocitose vesicular e “ATP halo” pericelular (Adaptado de Duarte-Araújo, 2011).

Está bem estabelecido que existem várias fontes de ATP no coração, tanto em condições fisiológicas como em situações de doença. O ATP e outros compostos de adenina são frequentemente associados com aminas simpaticomiméticas nas terminações nervosas (Lundberg *et al.*, 1983; Meldrum & Burnstock, 1983). Contudo, para além das evidências de que o ATP é libertado no coração juntamente com as catecolaminas (nomeadamente a NA) a partir dos terminais nervosos simpáticos (Hoyle & Burnstock, 1986; Gourine *et al.*, 2009), outros estudos demonstraram que este nucleótido pode provir de cardiomiócitos isquémicos, de eritrócitos, da agregação plaquetária, de células apoptóticas, do tecido cardíaco e inflamatório e de células

endoteliais ou musculares lisas (Forrester & Williams, 1977; Pearson & Gordon, 1979; Clemens & Forrester, 1981; Fredholm *et al.*, 1982; Gordon, 1986; Vial *et al.*, 1987; Christie *et al.*, 1992; Vassort, 2001). O ATP libertado pelos terminais nervosos simpáticos parece ser funcionalmente importante na região *pacemaker* porque alguns dos efeitos da estimulação do nervo simpático, incluindo a taquicardia, podem ser reproduzidos pela aplicação de ATP. Além disso, a fase precoce da taquicardia pode ser suprimida após a dessensibilização de purinoreceptores P2 (Bramich *et al.*, 1990). Assim, o ATP libertado a partir das terminações nervosas simpáticas pode aumentar ainda mais a contratilidade cardíaca estimulada pelos β_1R de forma aditiva ou mesmo de forma sinérgica (Zheng *et al.*, 1992). Estes resultados estabelecem o envolvimento do ATP e de purinoreceptores na regulação do ritmo cardíaco.

Uma vez que os nucleótidos são moléculas altamente polarizadas e não podem passar livremente as membranas celulares, as suas vias de libertação são um assunto de grande debate. Os nucleótidos extracelulares podem ser libertados massivamente para o espaço extracelular em resposta ao stresse ou à lesão celular (Figura 5). Para além disso, três mecanismos não líticos de efluxo de nucleótidos representam um percurso distinto e importante no aparecimento de nucleótidos no meio extracelular (Yegutkin, 2008). Os mecanismos celulares propostos incluem: (1) movimento eletrodifusional através de canais iónicos na membrana e durante a formação destes, incluindo hemicanais e canais ativados pela voltagem; (2) difusão facilitada por transportadores *ATP-binding cassette* (ABC) específicos de nucleótidos; (3) tráfego vesicular clássico e secreção exocítica de grânulos (Figura 5). No entanto, considerando que a ativação de receptores P2 ocorre a concentrações na gama de 10^{-6} a 10^{-4} M, torna-se difícil de explicar os níveis de ATP (nanomolares) nos fluidos extracelulares. Estudos recentes mostraram que a maior parte do ATP libertado é retido no espaço pericelular e pode ser consumido por ecto-nucleósido trifosfato difosfo-hidrolases (E-NTPDases) ligadas à membrana plasmática. Assim, as concentrações de ATP que circundam as células são suficientes para desencadear respostas purinérgicas - um fenómeno recentemente descrito como "ATP halo" (Yegutkin, 2008) (Figura 5).

Em situações fisiopatológicas como a hipóxia e a isquemia, os miócitos cardíacos libertam quantidades elevadas de ATP para o espaço extracelular (Forrester & Williams, 1977; Clemens & Forrester, 1981; Vial *et al.*, 1987; Wee *et al.*, 2007). A sua concentração extracelular pode variar dramaticamente dependendo das circunstâncias, já que a concentração intracelular estimada é de cerca de 1 mM (Figura 5). Deste modo, tendo em conta os fatores responsáveis pela libertação de

nucleótidos, o estado de ativação dos recetores purinérgicos depende em muito de condições de stresse ou de estados de doença de determinado órgão.

2.3.2 - Metabolismo de Nucleótidos de Adenina

O ATP extracelular libertado por vários tecidos após determinados estímulos é rapidamente metabolizado em ADO pela via das E-NTPDases, sendo este produto transportado para o interior das células onde é metabolizado ou usado como um substrato metabólico. Assim, a semi-vida do ATP exógeno administrado por via endovenosa é muito curta; na verdade, o ATP não é detetado em amostras de sangue retiradas de uma veia de um dado braço durante a administração simultânea de ATP (20 mg; *bolus* rápido) na veia do braço contralateral (Pelleg & Belhassen, 2010).

Os níveis de ATP no sistema coronário são geralmente bastante baixos (~1 nM) (Borst & Schrader, 1991) porque o ATP é catabolizado rapidamente (Jorgensen, 1956; Welford *et al.*, 1987). No entanto, no interstício do coração podem ser medidos maiores níveis de ATP (~40 nM) (Kuzmin *et al.*, 1998). Clinicamente, o ATP é utilizado no tratamento de arritmias supraventriculares. Uma vez que é rapidamente catabolizado em ADO no soro, o ATP bloqueia o nó AV dos pacientes pela resultante ativação dos A₁AR (que conduz à ativação vagal) (Saito *et al.*, 1986).

Por causa do seu envolvimento em processos fisiológicos (e.g. coagulação do sangue, inflamação vascular, reações imunes e certos tipos de cancro), as E-NTPDases são consideradas como potenciais alvos terapêuticos (Gendron *et al.*, 2002). Existem 8 genes que codificam os diferentes subtipos de E-NTPDases. Quatro destes subtipos (NTPDase 1, 2, 3, e 8) estão expressos na superfície celular e hidrolisam nucleótidos extracelulares (Zimmermann, 2000; Kukulski *et al.*, 2005), enquanto os subtipos 5 e 6 exibem uma localização intracelular, sendo posteriormente secretados (Figura 6). As NTPDases 4 e 7 estão localizadas exclusivamente no meio intracelular voltadas para o lúmen dos organelos celulares citoplasmáticos (Yegutkin, 2008) (Figura 6). As E-NTPDases desfosforilam uma variedade de nucleótidos trifosfatos (e.g. ATP e UTP) e difosfatos (e.g. ADP e UDP) com diferente especificidade e afinidade para o substrato. A NTPDase 1, também denominada de CD39, apirase ou ATPDase (5'-trifosfato de adenosina difosfohidrolase), hidrolisa o ATP e o ADP de forma semelhante; hidrolisa o ATP quase diretamente em 5'-monofosfato de adenosina (AMP) com a produção de pequenas quantidades de ADP, removendo um fosfato de uma vez. Por outro lado, a enzima NTPDase 2, designada igualmente como CD39L1, ATPase (5'-trifosfatase de adenosina), tem uma preferência pelo ATP dez vezes superior à do ADP; hidrolisa o ATP em ADP, sendo este último

lentamente desfosforilado em AMP (Matsuoka & Ohkubo, 2004; Robson *et al.*, 2006). A NTPDase 3 (CD39L3) e a NTPDase 8 (ATPDase hepática) são descritas como intermediárias funcionais entre a NTPDase 1 e a NTPDase 2 (Kukulski *et al.*, 2005). A NTPDase 3 hidrolisa preferencialmente o ATP (5:1). Finalmente, o AMP é hidrolisado a ADO e fosfato inorgânico pela ecto-5'-nucleotidase (CD73), uma enzima ancorada a glicosilfosfatidilinositol localizada na superfície da célula. Desta forma, o ATP pode exercer a sua atividade de uma forma direta ou pela ação dos seus produtos (ADP, AMP e ADO). Os efeitos do ATP são maioritariamente mediados pelos P2XR, no entanto o composto poderá também exercer efeito nos P2YR, tanto através do ATP (P2Y₁₁R) como através do seu produto de metabolismo, o ADP (P2Y_{1,12,13}R) (Erlinge & Burnstock, 2008).

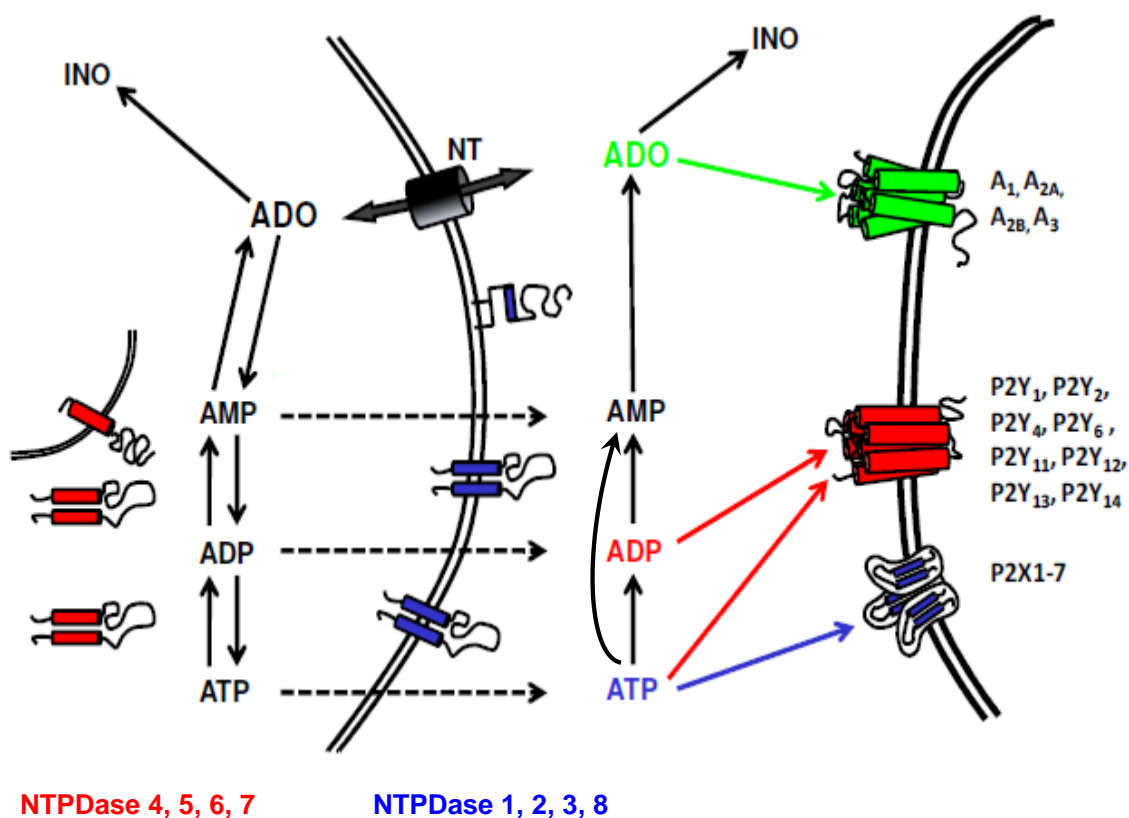


Fig. 6 – Biossíntese e catabolismo dos nucleótidos de adenina. As NTPDase 1, 2, 3, e 8 estão expressas na superfície celular e hidrolisam nucleótidos extracelulares, enquanto os subtipos 4, 5, 6 e 7 exibem uma localização intracelular. As NTPDases desfosforilam uma variedade de nucleótidos trifosfatos (ATP) e difosfatos (ADP) com diferente especificidade e afinidade para o substrato. No espaço extracelular, o ATP e os seus produtos de degradação, o ADP e a ADO, ativam subtipos de receptores purinérgicos P1 (A₁, A_{2A}, A_{2B} e A₃) e P2 (P2X₁₋₇ e P2Y_{1, 2, 4, 6, 11, 12, 13, 14}). Transportador de nucleósido bidirecional (NT) (Adaptado de Duarte-Araújo, 2011).

Esta metabolização sequencial não só termina a sinalização do ATP, mas também gera intermediários com propriedades de sinalização distintas (Figura 6). A

contribuição relativa das espécies distintas de E-NTPDases para a modulação da sinalização purinérgica pode depender da distribuição celular e tecidual diferencial, da regulação da expressão, do alvo para os domínios específicos da membrana, mas também da disponibilidade do substrato e da preferência do substrato (Duarte-Araujo *et al.*, 2009). Compreender a contribuição efetiva destas enzimas é de importância central para prever quando a modulação purinérgica mediada por recetores P2 ganha relevância funcional.

2.3.3 - Papel dos Nucleótidos de Adenina na Função Cardíaca

Como já referido anteriormente, os nucleótidos desempenham um papel importante nos sistemas biológicos, existindo várias evidências que suportam a relevância do sistema purinérgico na regulação cardiovascular (Olsson & Pearson, 1990; Ralevic & Burnstock, 1991; Erlinge, 1998). A sinalização pelos nucleótidos de adenina é limitada espacial e temporalmente, atuando de forma autócrina e / ou parácrina durante um curto período de tempo (Jacobson, 2009).

Desde que Drury e Szent-Györgyi (Drury & Szent-Gyorgyi, 1929) provaram as ações do ATP extracelular no coração e nos vasos sanguíneos, foram descritos vários efeitos no sistema cardiovascular. Estes incluem efeitos inotrópicos negativos e positivos (dependentes da espécie), cronotrópico e dromotrópico negativos bem como efeitos anti-hipertroóficos miocárdicos (Vassort, 2001). Uma série de efeitos fisiológicos adicionais do ATP no coração têm sido observados, como inibição do transporte de glucose (Fischer *et al.*, 1999; Gergs *et al.*, 2008), envolvimento no pré-condicionamento (Needleman *et al.*, 1974; Zheng *et al.*, 1996) e uma diminuição da pressão arterial. Foi sugerido que o efeito vasodilatador do ATP pode ser mediado pelo seu produto de degradação, a ADO (Berne, 1963). Isto levou a estudos exaustivos sobre os efeitos da ADO no sistema cardiovascular. Só mais tarde foi renovado o interesse no ATP *per se*; em parte, impulsionado pela hipótese de que o ATP pode ser um co-transmissor nos nervos adrenérgicos e colinérgicos (Burnstock *et al.*, 1970), ao ser libertado a partir de terminais nervosos com a NA e a ACh (Burnstock, 1972).

Vários foram os estudos onde verificaram que os nucleótidos de adenina exerciam efeitos depressores no coração dos mamíferos, particularmente nas aurículas; estes efeitos consistiam em respostas cronotrópicas e inotrópicas negativas (Hollander & Webb, 1957; Hopkins, 1973; Burnstock & Meghji, 1983), um efeito anti-adrenérgico e uma inibição da neurotransmissão adrenérgica (Burnstock, 1980; Pelleg *et al.*, 1990). Estes efeitos podem estar relacionados com a estimulação dos recetores

purinérgicos P1, uma vez que foram antagonizados pelo antagonista do AR não seletivo, a 8-fenilteofilina. Os efeitos são semelhantes aos da ACh e podem ser mediados por um aumento das correntes de K^+ (Belardinelli & Isenberg, 1983) e um ligeiro decréscimo nas correntes de Ca^{2+} (Cerbai *et al.*, 1988).

Um aumento na tensão contrátil por compostos de adenina e / ou ADO também tem sido observada em coração de rã (Goto *et al.*, 1976; Flitney & Singh, 1980; Burnstock & Meghji, 1981) e de mamíferos (Chiba & Himori, 1975; Dorigo *et al.*, 1988; Legssyer *et al.*, 1988) e em cardiomiócitos de mamíferos; podendo atuar em sinergia com agonistas β -adrenérgicos para aumentar a contratilidade (Danziger *et al.*, 1988; Zheng *et al.*, 1996; Podrasky *et al.*, 1997; Mei & Liang, 2001; Vassort, 2001). Contudo, alguns autores têm prestado pouca atenção ao efeito positivo, uma vez que o reconhecem como uma recuperação do inotropismo negativo (Jahnel & Nawrath, 1989). De acordo com alguns estudos, a ADO e o ATP, em concentrações elevadas, também induzem um efeito inotrópico positivo em preparações ventriculares (Dorigo *et al.*, 1988; Legssyer *et al.*, 1988; Scamps *et al.*, 1990). Em ventrículo de ratazana o ATP não exerceu um efeito inotrópico negativo, tendo sido verificado de forma consistente um efeito inotrópico positivo ligeiro (Legssyer *et al.*, 1988; Scamps *et al.*, 1990). Este foi acompanhado por um aumento das correntes de Ca^{2+} através dos canais do tipo L e um consequente aumento de Ca^{2+} intracelular (Scamps *et al.*, 1990; Hirano *et al.*, 1991). O ATP pode não sensibilizar as proteínas contráteis ao Ca^{2+} (Fabiato & Fabiato, 1978), mas pode alcalinizar o citosol, o que pode contribuir para o seu efeito inotrópico positivo (Puceat *et al.*, 1993).

Tendo em conta a sinalização dos recetores P2 e a sua expressão cardíaca é expectável que estes possam interferir na função cardíaca através da regulação da sinalização mediada pelo Ca^{2+} intracelular. Em miócitos ventriculares de ratazana, o ATP aumenta os transientes de Ca^{2+} intracelular, associado com um aumento da amplitude contrátil dos miócitos (Danziger *et al.*, 1988; De Young & Scarpa, 1989; Scamps *et al.*, 1990; Christie *et al.*, 1992). Outros estudos mostram que o ATP tanto pode aumentar como diminuir as correntes de Ca^{2+} do tipo L nos miócitos ventriculares (Alvarez *et al.*, 1990; Qu *et al.*, 1993). Alguns autores sugerem que no coração e em miócitos da aorta de ratazana o ATP extracelular ativa a repartição de fosfoinosítídeos e a formação de IP_3 (Legssyer *et al.*, 1988), tal como em outras células (Phaneuf *et al.*, 1987). Este nucleótido modula, ainda, correntes de K^+ nas células auriculares (Matsuura & Ehara, 1997), ativa correntes catiónicas nas células do nó SA de coelho (Friel & Bean, 1988; Shoda *et al.*, 1997), afeta vários trocadores iónicos (Puceat & Vassort, 1995) e regula os níveis intracelulares de Ca^{2+} nas células nodais de anfíbio (Ju *et al.*, 2003). De facto, o papel desempenhado pelo Ca^{2+} intracelular na atividade

“marcapasso” tem sido objeto de intensa investigação e alguma controvérsia (Ju *et al.*, 2003; Lyashkov *et al.*, 2007).

Em aurículas de porquinho-da-índia e ratazana estimuladas eletricamente verificou-se um efeito inotrópico negativo inicial do ATP seguido de um efeito inotrópico positivo; o efeito inotrópico negativo do ATP foi mediado por recetores P1 da ADO, ao ter sido sensível à 1,3-dipropil-8-ciclopentilxantina (DPCPX), um antagonista seletivo do subtipo de recetor A₁; o efeito inotrópico positivo do ATP foi abolido pela suramina (em porquinho-da-índia) ou pelo *reactive blue 2* (RB2) (em ratazana) (Mantelli *et al.*, 1993; Frolidi *et al.*, 1994). Além disso, observou-se que quando os recetores inibitórios da ADO eram bloqueados, o ATP produzia um efeito inotrópico positivo, provavelmente mediado pela estimulação de P2YR. Gergs e colaboradores observaram igualmente uma resposta bifásica do ATP em tecido auricular humano. Porém, este efeito não foi sensível à ação dos antagonistas suramina e DPCPX, usados anteriormente em aurículas de ratazana, denotando o envolvimento de recetores distintos (Gergs *et al.*, 2008). Também é verdade que os efeitos desencadeados pelos nucleótidos de adenina (bem como outros mediadores) são na maioria das vezes dependentes da espécie estudada, e inclusive do tecido ou da parte do tecido avaliado.

A estimulação dos P2YR pelo ATP induz uma acumulação rápida e transiente de IP₃ numa variedade de células em cultura, tais como células endoteliais, hepatócitos, leucócitos e eritrócitos (Charest *et al.*, 1985). Este efeito está associado a um aumento rápido da concentração de Ca²⁺ citoplasmático (Boeynaems & Pearson, 1990). Além disso, foi demonstrado que o ATP e outros análogos aumentam a concentração de Ca²⁺ intracelular em miócitos de ratazana com uma ordem de potência dos agonistas indicativos do subtipo de P2YR (Bjornsson *et al.*, 1989). Neste último estudo, a gama de concentrações do ATP capaz de aumentar o nível de Ca²⁺ intracelular é comparável às concentrações capazes de aumentar a contratilidade nas preparações auriculares. Deste modo, avançou-se com a hipótese de que o efeito inotrópico positivo induzido pelo ATP é mediado pela estimulação de recetores P2 específicos, provavelmente pertencentes ao subtipo de P2YR, e que, de acordo com observações anteriores, este efeito envolve o aumento na concentração de Ca²⁺ intracelular (Mantelli *et al.*, 1993). Vários estudos sugerem que o ATP estimula o aumento do Ca²⁺ citosólico como resultado do envolvimento do P2Y₂R acoplado ao IP₃ e / ou dos P2XR ionotrópicos (Danziger *et al.*, 1988; Frolidi *et al.*, 1994; Scamps & Vassort, 1994; Podrasky *et al.*, 1997; Mei & Liang, 2001).

Existem evidências que mostram que os efeitos inotrópicos do ATP dependem da produção de IP₃ e também de AMPc (Balogh *et al.*, 2005). Os efeitos inotrópicos

das catecolaminas, atuando sobre os β_1R , são mediados por um aumento do AMPc e antagonistas destes recetores são fármacos importantes no tratamento da hipertensão e na redução da mortalidade na insuficiência cardíaca congestiva. De forma semelhante, o ATP aumenta o AMPc nos cardiomiócitos e pode atuar em sinergia com os agonistas dos β_1R , como o isoproterenol, mediante a ativação diferencial das isoformas da AC sensíveis ao Ca^{2+} (Flitney & Singh, 1980; Puceat *et al.*, 1998; Vassort, 2001). A força de contração miocárdica é marcadamente modulada por catecolaminas; após a estimulação β -adrenérgica, o AMPc acumulado ativa a proteína cinase A (PKA) que, por sua vez, fosforila várias proteínas envolvidas no acoplamento excitação-contração. Apesar destes resultados, ainda não foi esclarecido o subtipo de recetor P2 responsável pelo aumento do AMPc devido ao ATP nos cardiomiócitos (Vassort, 2001). O envolvimento do P2Y₁₁R na ativação da AC com o acoplamento a proteínas G_s é uma possibilidade (Communi *et al.*, 1999; Vassort, 2001). A ativação indireta de uma isoforma da AC regulada pelo Ca^{2+} intracelular, não é possível excluir com os dados existentes.

Os efeitos cronotrópicos do ATP não têm sido facilmente determinados devido ao efeito inibitório dominante da ADO resultante do seu metabolismo extracelular no nó AV. O ATP aumenta a frequência de contração em co-culturas de neurónios-miócitos, mas o efeito do nucleótido é marcadamente reduzido em culturas de miócitos não inervados (Horackova *et al.*, 1994). O ATP pode ter potencial arritmogénico baseado na sua capacidade de aumentar o automatismo e as pós-despolarizações precoces (Vassort, 2001). A administração *in vivo* de ATP em ratazanas adultas promoveu um efeito cronotrópico positivo, independente dos recetores P1 e da modulação simpática e parassimpática, sem alterar o volume de ejeção (Bilalova *et al.*, 2000). Apesar destas observações e do facto do P2X₁R estar co-localizado com a conexina-43 das *gap junctions* cardíacas responsáveis pela transmissão rápida do estímulo contrátil entre os cardiomiócitos (Jiang *et al.*, 2005), não existem evidências que suportem o papel importante dos recetores P2 no cronotropismo cardíaco e, consequentemente, no aparecimento de disritmias.

Mei e Liang (Mei & Liang, 2001) verificaram em preparações de coração intacto que a ativação do recetor P2 exerce um efeito inotrópico positivo ligeiro, não sendo acompanhado por um efeito cronotrópico significativo. Estas observações contrastam com o efeito cronotrópico positivo que acompanhou o efeito inotrópico positivo induzido pelo agonista β -adrenérgico. Assim, é possível que o aumento da contratilidade pelo agonista do recetor P2 ocorra sem o detrimento de um aumento da frequência de contração. Esta propriedade pode tornar tal agonista um agente benéfico no tratamento da disfunção ventricular e na insuficiência cardíaca. Se o efeito

inotrópico positivo mediado pelos recetores P2 também exhibe uma rápida dessensibilização induzida pelo agonista, como a observada com os recetores β -adrenérgicos, é pouco claro e necessita uma investigação mais aprofundada. Futuros estudos são necessários para determinar se o agonista do recetor P2 representa um novo alvo terapêutico.

2.4- Nucleótidos de Uracilo

A sinalização mediada por nucleótidos de adenina tem sido identificada em praticamente todas as células e tecidos. No entanto, o conhecimento sobre a sinalização mediada por pirimidinas é mais limitado.

O mesmo se verifica no que toca à libertação. Embora a libertação de purinas tenha sido extensivamente estudada em diversos modelos, poucos estudos existem sobre a libertação de pirimidinas. A libertação contínua de UDP-glucose a partir de células endoteliais foi detetada, no entanto nenhuma correlação com a libertação de ATP foi observada (Lazarowski *et al.*, 2003). Recentemente foi demonstrado que o UTP é libertado a partir do coração de porco durante a isquemia cardíaca (Erlinge *et al.*, 2005) e que os níveis deste nucleótido estão aumentados durante o enfarte do miocárdio em humano, dando a primeira evidência de libertação de UTP no espaço extracelular (Wihlborg *et al.*, 2006). Estes nucleótidos de uracilo podem ainda ser libertados, tal como os de adenina, em resposta ao stresse ou à lesão celular, bem como durante o processo de libertação de neurotransmissores e a formação de canais membranares com dimensões suficientes para o seu efluxo a partir do interior das células. A libertação destes compostos causa hipertrofia dos cardiomiócitos (Pham *et al.*, 2003) e tem um efeito cardioprotetor em miócitos cardíacos em cultura sujeitos a hipóxia (Yitzhaki *et al.*, 2005) através da ativação de P2Y₂R (Cohen *et al.*, 2011).

O ATP e o UTP são estruturalmente semelhantes, no entanto a biossíntese das pirimidinas é mais complexa. O primeiro produto, o 5'-monofosfato de uridina (UMP), é previamente fosforilado para formar um difosfato (UDP) e, em seguida, para formar um trifosfato (UTP) (Koolman, 2005). Para além de terem sido descritos inúmeros efeitos purinérgicos é também possível encontrar, embora em menor escala, evidências experimentais demonstrativas do papel do UTP (e de outros nucleótidos de uracilo) como mediadores de vias de sinalização extracelulares importantes (Erlinge & Burnstock, 2008). O UTP ativa exclusivamente P2Y_R metabotrópicos, que por sua vez também podem ser alvo dos nucleótidos de adenina ou dos produtos da degradação do UTP, como por exemplo o UDP. O P2Y₂R é igualmente ativado por UTP e por ATP (Lustig *et al.*, 1993; Parr *et al.*, 1994), enquanto o P2Y₄R é ativado por UTP (Cohen *et*

et al., 1990; Nguyen *et al.*, 1995; Nicholas *et al.*, 1996b). Relativamente aos recetores P2 ativados pelos produtos da hidrólise do UTP, salienta-se o P2Y₆R ativado por UDP (Chang *et al.*, 1995; Nicholas *et al.*, 1996b) e o P2Y₁₄R ativado por UDP-glucose (Erlinge & Burnstock, 2008). À semelhança dos nucleótidos de adenina, também os nucleótidos de uracilo se revelaram importantes na regulação da função cardíaca. No coração de mamíferos, estes nucleótidos exercem múltiplas ações, incluindo efeitos electrofisiológicos e inotrópicos (Legssyer *et al.*, 1988; Frolidi *et al.*, 1997; Wu *et al.*, 1998). Em 1994, com Frolidi e seus colaboradores, surgiu o primeiro trabalho focando o efeito do UTP no coração de mamíferos (Frolidi *et al.*, 1994). Analogamente ao observado com o ATP, o UTP causou um efeito inotrópico positivo mediado por recetores sensíveis à suramina, em aurículas de ratazana e em cardiomiócitos ventriculares de ratazana e porquinho-da-índia (Frolidi *et al.*, 1994; Frolidi *et al.*, 1997; Podrasky *et al.*, 1997; Frolidi *et al.*, 2001). Além disso, o UTP, tal como o ATP, inibiu e / ou estimulou a contractilidade miocárdica; em particular, estes nucleótidos induzem diminuições e aumentos no inotropismo basal de forma sequencial (Legssyer *et al.*, 1988; Frolidi *et al.*, 1994). Esta peculiaridade sugere que o ATP e também o UTP desempenham uma ação reguladora da atividade cardíaca. No entanto, têm efeitos opostos no que respeita às suas ações sobre a hipertrofia cardíaca: o UTP causa hipertrofia dos cardiomiócitos neonatais (Pham *et al.*, 2003), contrariamente ao ATP que inibe a hipertrofia podendo induzir a apoptose e necrose das células (Zheng *et al.*, 1996). Num trabalho recente foi sugerido que os P2Y₂R estão envolvidos na remodelação cardíaca ao induzir uma resposta pró-fibrótica (Braun *et al.*, 2010).

Também em humanos foram observados efeitos inotrópicos positivos do UTP, provavelmente pela ativação de P2Y₂R, e demonstrados os efeitos inotrópicos do UDP, mediados por P2Y₆R através de uma via dependente de IP₃. Os análogos estáveis do UTP e do UDP, respetivamente o 5'-O-3-tiotrifosfato de uridina (UTPγS; agonista P2Y_{2,4}) e o 5'-O-tiodifosfato de uridina (UDPβS; agonista P2Y₆), causam um efeito inotrópico positivo pronunciado em cardiomiócitos de ratinho (Wihlborg *et al.*, 2006). Assim, as pirimidinas extracelulares (UTP e UDP) podem ser importantes fatores inotrópicos envolvidos no desenvolvimento da doença cardíaca (Wihlborg *et al.*, 2006), através da ativação de P2Y₂R e P2Y₆R, estimulando as mesmas vias intracelulares da angiotensina II. Os agonistas sintéticos podem, deste modo, ser usados como agentes inotrópicos em situações de choque circulatório e os antagonistas poderão ter efeitos benéficos no tratamento da hipertensão e da insuficiência cardíaca congestiva, de forma equivalente aos antagonistas dos recetores da angiotensina II (Erlinge & Burnstock, 2008).

II. OBJETIVO

Desde que foi proposta a existência de recetores de superfície para os nucleótidos de adenina e uracilo tornou-se claro que estes exercem um papel importante na sinalização intercelular, para além da intervenção destas moléculas no metabolismo energético das células (Erlinge & Burnstock, 2008). Como foi referido na introdução, os nucleótidos extracelulares modulam a função cardiovascular em diversas situações, quer fisiológicas quer patológicas, atuando de forma autócrina e / ou parácrina. Sabe-se, desde o trabalho pioneiro de Drury e Szent-Györgyi (1929) (Drury & Szent-Gyorgyi, 1929), que o ATP exerce efeitos pleomórficos no sistema cardiovascular dependentes da ativação de purinoreceptores P2: P2X (ionotrópicos; 7 subtipos) e P2Y (metabotrópicos; 8 subtipos) (Fredholm *et al.*, 1994; Burnstock, 2004). No entanto, esses efeitos podem ser encurtados pela sua rápida metabolização em ADP, AMP e ADO pela via das E-NTPDases ligadas à membrana celular. Por exemplo, a ADO, atuando nos A₁AR, é um importante agente cardiodepressor que desencadeia respostas dromotrópicas, cronotrópicas e inotrópicas negativas.

Estudos prévios, utilizando aurículas esquerdas isoladas estimuladas eletricamente, demonstraram que os efeitos do ATP e da ADO surgem numa dimensão temporal diferente e são, frequentemente, contraditórios. Contudo, o conhecimento do papel do ATP (e dos nucleótidos relacionados) sobre o automatismo cardíaco (frequência cardíaca) é muito limitado. Até ao momento poucos foram os ensaios realizados sobre esta temática que abordaram a relação entre os níveis de ATP e uma eventual sinalização purinérgica; poucos são os dados disponíveis sobre os subtipos de purinoreceptores e os mecanismos intracelulares responsáveis pelos efeitos crono- e inotrópicos desencadeados pelo ATP no miocárdio. Desta forma, o objetivo deste projeto visava colmatar falhas na literatura relativamente ao papel dos recetores P2 sobre a atividade espontânea do coração, já que grande parte dos trabalhos publicados sobre este assunto utilizam tecido miocárdico sujeito a estimulação (*pacing*) elétrica.

Assim, neste estudo avaliaram-se os efeitos do ATP e dos seus metabolitos sobre a frequência (cronotropismo) e a força (inotropismo) de contração de aurículas isoladas de ratazana a contrair espontaneamente.

III. MATERIAL E MÉTODOS

1. Animais

As experiências foram realizadas em aurículas isoladas a contrair espontaneamente de ratazanas da estirpe Wistar (*Rattus norvegicus*) (Charles River – CRIFFA, Barcelona, Espanha; Biotério do ICBAS, Porto, Portugal), de ambos os géneros e com pesos compreendidos entre os 200-300 g (Figura 7A). Os animais foram mantidos em condições ideais de humidade, alimentação, temperatura (constante, 21°C) e um ciclo regular de luz (06:30-19:30 h) – escuro (19:30-06:30 h). A manipulação e experiência animal seguiram as indicações definidas pela Diretiva do Conselho das Comunidades Europeias (2010 / 63 / UE).

2. Preparações e Condições Experimentais

De acordo com as normas éticas respeitantes ao bem-estar animal (Decreto-Lei nº113 / 2013) procedeu-se à eutanásia dos animais por decapitação, seguida de exsanguinação (guilhotina para roedores, Stoelting 51330). O coração (Figura 7B) foi rapidamente removido por toracocentese e colocado numa solução fisiológica de Tyrode oxigenada com 95% O₂ + 5% CO₂ (pH 7,4) com a seguinte composição (mM): NaCl 137; NaHCO₃ 11,9; glucose 11,2; KCl 2,7; CaCl₂ 1,8; MgCl₂ 1; NaH₂PO₄ 0,4.

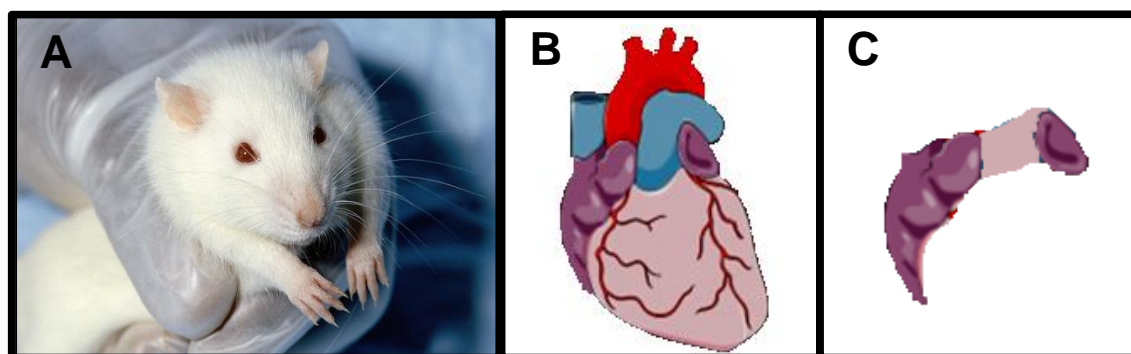


Fig. 7 – Animais e preparação experimental. **A** - Ratazanas da estirpe Wistar (*Rattus norvegicus*); **B** - Isolamento do órgão de interesse, o coração; **C** - Aurícula direita e esquerda intactas e unidas após disseção.

Esta solução foi mantida à temperatura ambiente para provocar paralisia cardíaca por redução da atividade metabólica das preparações. No período entre o isolamento do coração e a sua paralisia, permitiu-se que este contraísse espontaneamente com a finalidade de expulsar o sangue contido nas suas cavidades. De forma semelhante ao

previamente descrito (Ford & Broadley, 1999), com algumas alterações, procedeu-se, de seguida, à disseção conjunta de ambas as aurículas. Para facilitar a disseção, cada um dos apêndices auriculares foi previamente atado com um fio de sutura. Posteriormente, as duas aurículas foram cuidadosamente isoladas dos ventrículos pelo sulco AV garantindo que o nó SA permanecia intacto. No final da disseção, as aurículas (direita e esquerda) mantinham-se intactas e unidas, contraindo espontânea e ritmicamente (Figura 7C).

Após o isolamento, as aurículas foram montadas em banhos de órgãos com 14 mL de capacidade e perfundidas continuamente com a solução de Tyrode oxigenada mantida a 37°C (Figura 8). Para tal, as aurículas foram fixadas verticalmente pelas extremidades auriculares a um suporte de acrílico e a um transdutor de força isométrico (MLT050 / D, ADInstruments, Colorado Springs, CO, USA). A tensão isométrica do tecido foi registada continuamente utilizando um transdutor de força devidamente ligado a um sistema informatizado de aquisição de dados PowerLab (Chart 5, version 4.2; ADInstruments, Colorado Springs, CO, USA) (Figura 8).



Fig. 8 – Representação exemplificativa do *set-up* de contração onde são realizados os estudos miográficos após montagem das aurículas isoladas no banho de órgãos.

As experiências foram realizadas em tecidos estirados previamente com uma tensão aproximada de 9,8 mN. A perfusão contínua das preparações com a solução de Tyrode aquecida e oxigenada durante cerca de 30-60 minutos (Figura 9) permitiu a recuperação progressiva do ritmo sinusal das contrações auriculares. Este período de equilíbrio foi mantido até que se atingissem valores de frequência espontânea e de amplitude contrátil constantes durante pelo menos 5 minutos. Atingido o equilíbrio, os fármacos a testar foram aplicados em regime de incubação, de forma a se obterem curvas de concentração-resposta não cumulativas, procedendo-se a uma lavagem de

15 minutos entre cada concentração. Quando nas mesmas preparações se pretendiam realizar várias curvas procedia-se a uma lavagem entre as curvas até que as bandas atingissem os valores semelhantes aos iniciais (~30 a 60 minutos) (Figura 9). Os fármacos foram removidos do banho por perfusão das preparações com a solução de Tyrode aquecida e oxigenada. É ainda importante referir que não se realizaram curvas concentração-resposta de diferentes fármacos utilizando a mesma preparação, ou seja, em cada preparação experimental foi testado unicamente um protocolo.

Os registos miográficos permitiram avaliar a frequência (efeito cronotrópico) e a força (efeito inotrópico) de contração espontânea das aurículas isoladas de ratazana. Em algumas das experiências, o desenvolvimento da força isométrica foi testado a uma frequência fixa de 240 batimentos por minuto (4 Hz). Ou seja, nestas experiências testaram-se os efeitos de determinados fármacos utilizando aurículas esquerdas estimuladas eletricamente e aurículas direitas a contrair espontaneamente. A estimulação elétrica auricular (4 Hz, 2 ms) foi realizada utilizando um estimulador Grass S48 (Quincy, MA, EUA) por meio de dois elétrodos de platina posicionados em cada lado das preparações. Antes do equilíbrio, as aurículas esquerdas eram estimuladas com uma voltagem 200% acima do limiar de excitabilidade, de forma a recrutar todas as fibras e mimetizar o que acontece “*in vivo*”.

3. Protocolos Experimentais

Após a estabilização da preparação (~30-60 minutos) mediante perfusão contínua com solução de Tyrode, interrompia-se a perfusão e a preparação equilibrava cerca de 15 minutos. Após este tempo de equilíbrio iniciava-se a incubação com os diferentes fármacos a testar, em regime não cumulativo (Figura 9). A Figura 26 (ver Anexos) resume as manipulações farmacológicas efectuadas neste estudo.

Os fármacos testados foram o ATP (0,01-1 mM; ligando dos P2XR e P2YR) e o ADP (0,01-1 mM; ligando dos P2Y_{1,12,13}R), no que respeita aos nucleótidos de adenina, e a ADO (100 µM; ligando dos recetores P1) como nucleósido de adenina. Também os nucleótidos do uracilo, o UTP (0,01-1 mM) e o UDP (0,01-1 mM) foram testados. O UTP atua principalmente nos P2Y_{2,4}R, enquanto o UDP é o ligando ativo do P2Y₆R.

O ATP (0,01-1 mM), o ADP (0,01-1 mM) e a ADO (100 µM) foram testados na presença de DPCPX (100 nM; antagonista seletivo do A₁AR). O nucleótido trifosfato foi igualmente testado na presença de: (1) polioxometalato 1 (POM-1; 100 µM; inibidor das E-NTPDases 1, 2, 3); (2) POM-1 (100 µM; inibidor das E-NTPDases 1, 2, 3) e

DPCPX (100 nM; antagonista seletivo do A₁AR); (3) piridoxal fosfato-6-azo(ácido benzeno-2,4-dissulfônico) (PPADS; 10 μM; antagonista não seletivo dos P2XR); (4) suramina (10 μM; antagonista não seletivo dos recetores P2); (5) 3-[[5-(2,3-diclorofenil)-1*H*-tetrazol-1-il]metil]piridina (A-438079; 3 μM; antagonista seletivo do P2X7R); (6) 5-(3-bromofenil)-1,3-dihidro-2*H*-benzofuro[3,2-*e*]-1,4-diazepin-2-ona (5'-BDBD; 10 μM; antagonista seletivo do P2X4R); (7) ivermectina (10 μM; modulador alostérico positivo do P2X4R); (8) ivermectina (10 μM) e DPCPX (100 nM); sendo que nestes protocolos experimentais foi testada apenas a concentração de 100 μM de ATP.

O ADP, apenas na concentração de 100 μM, foi também testado na presença de 2'-deoxy-*N*⁶-metiladenosina 3',5'-bifosfato (MRS2179; 0,3 μM; antagonista seletivo do P2Y₁R) e na presença conjunta de MRS2179 (0,3 μM) e DPCPX (100 nM).

A influência do α,β-meATP (100 μM; análogo estável do ATP e agonista dos P2X1R, P2X3R e P2X2/3R) e do 5'-(γ-tio)trifosfato de adenosina (ATPγS; 1, 10, 30 e 100 μM; análogo estável do ATP) nas respostas contráteis foram também testadas. O ATPγS (100 μM) foi igualmente testado na presença do antagonista dos A₁AR, DPCPX (100 nM).

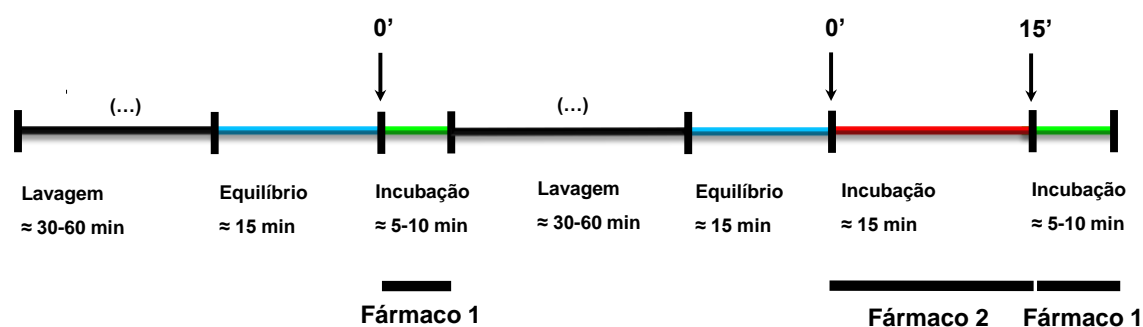


Fig. 9 – Representação esquemática simplificada do procedimento experimental nas experiências de contração espontânea de aurículas isoladas de ratazana. Apesar de não representado, este procedimento pode ser repetido várias vezes com um período de lavagem entre cada incubação do fármaco 1 de 15 minutos. Isto acontece para o caso em que várias concentrações do fármaco são testadas.

Todas as soluções de agonistas testados foram incubadas cerca de 5-10 minutos no banho (Figura 9), até estabilização da resposta ao agonista. Na maioria dos protocolos experimentais realizados com antagonistas / inibidores, as preparações foram pré-incubadas com o antagonista / inibidor durante pelo menos 15 minutos antes da aplicação dos fármacos a testar (agonistas) (Figura 9). Nos protocolos em que se utilizou DPCPX em associação com outros compostos, o antagonista do A₁AR foi pré-incubado 15 minutos antes da aplicação dos outros fármacos moduladores, nomeadamente ivermectina e MRS2179.

A escolha das concentrações dos agonistas e antagonistas / inibidores usados neste estudo baseou-se na avaliação dos seus efeitos através da análise de curvas de concentração-resposta realizadas previamente ou no intervalo de seletividade desses compostos descritos na literatura, garantindo que os vários antagonistas / inibidores produziam efeitos depressores ou estimuladores cardíacos comparáveis. No caso da DPCPX, a concentração a usar baseou-se na literatura (Musial *et al.*, 2012) e em resultados anteriores obtidos no Laboratório de Farmacologia e Neurobiologia do ICBAS, onde demonstraram que 100 nM de DPCPX bloqueava completamente a atividade do A₁AR induzida pela (R)-N⁶-(1-metil-2-feniletil)adenosina (R-PIA), um análogo estável da ADO. Foram também tomadas precauções de modo a que nenhum dos compostos pudesse modificar a frequência e / ou a tensão das contrações auriculares espontâneas por mais de 30% quando utilizados sozinhos.

4. Materiais e Soluções

Os fármacos ATP, ADP, UTP, UDP, ADO, α,β -meATP, ATP γ S, suramina e ivermectina foram adquiridos à Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), enquanto a POM-1, o A-438079, o MRS2179, o 5'-BDBD foram obtidos da Tocris Cookson Inc. (Bristol UK). A DPCPX foi obtida da Sigma / RBI (Natick, MA) e o PPADS foi obtido da Ascent Scientific (Bristol, UK).

As soluções de armazenamento de A-438079, 5'-BDBD e ivermectina foram preparadas em dimetilsulfóxido (DMSO), enquanto a DPCPX foi dissolvida em 99% DMSO / 1% NaOH 1 mmol L⁻¹ (v v⁻¹). As soluções dos restantes fármacos foram preparadas, diariamente, em água bi-distilada ou diretamente dissolvidas na solução de Tyrode. Todas as soluções de armazenamento foram fracionadas em alíquotas mais pequenas e congeladas a -20°C. Diariamente foram feitas diluições das soluções de armazenamento em solução Tyrode e foram realizados controlos adequados com os solventes utilizados. Não se observaram alterações estatisticamente significativas nas experiências controlo realizadas na ausência e na presença dos diversos solventes aplicados na concentração máxima utilizada (0,5% v v⁻¹). A solução de Tyrode era também preparada diariamente, sendo os reagentes utilizados do mais elevado grau de pureza disponível. O pH da solução de superfusão não foi alterado com a adição de fármacos nas concentrações máximas aplicadas às preparações.

5. Avaliação dos Dados e Análise Estatística

As contrações isométricas foram registadas e analisadas antes e depois da adição de cada fármaco na concentração desejada. A partir dos sinais registados informaticamente analisaram-se os seguintes parâmetros: (1) força contrátil (efeito inotrópico); e (2) frequência de contração (efeito cronotrópico) (Figura 10).

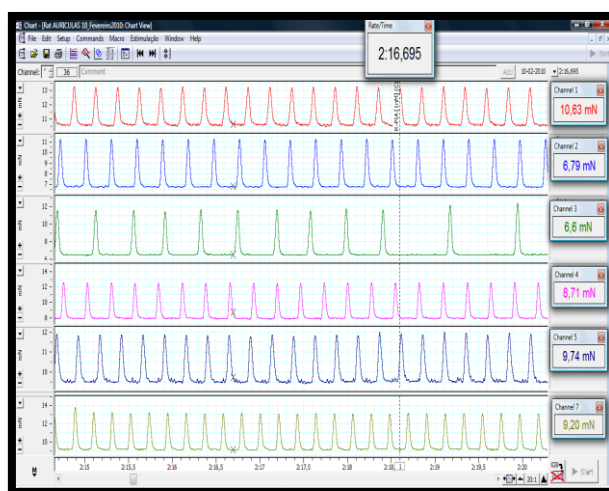


Fig. 10 – Representação exemplificativa das contrações isométricas em aurículas a contrair espontânea e ritmicamente. O número de “ondas” reflete a frequência cardíaca e a sua amplitude média corresponde à força de contração desenvolvida.

O esquema da Figura 11 mostra a forma como foram quantificados os efeitos crono- e inotrópicos do ATP, durante as Fases designadas por I e II (e dos restantes agonistas estudados que apresentavam um efeito bifásico). Relativamente à força de contração, a Fase I representa a diferença entre a tensão ativa mínima após a aplicação do fármaco e a tensão ativa imediatamente antes da sua aplicação (valor basal), dividida por este valor basal; a Fase II representa a diferença entre a tensão ativa máxima (após estabilização) e a tensão ativa imediatamente antes da sua aplicação (valor basal), dividida por este valor basal. Desta forma, tanto os efeitos negativos (Fase I) como positivos (Fase II) foram expressos em percentagem do mesmo valor basal. A frequência de contração (número de batimentos por minuto) foi obtida por extrapolação, multiplicando-se por 10 o número de contrações auriculares quantificados no intervalo de 6 segundos. Tendo em conta a possível interdependência existente entre o crono- e inotropismo, avaliou-se a variação da frequência de contração em 2 fases distintas: durante o efeito inotrópico negativo (Fase I) e positivo (Fase II), normalizada para a frequência de contração basal (valor medido imediatamente antes da aplicação do fármaco) (ver Gergs *et al.*, 2008) (Figura

11). Nos vários protocolos experimentais, os resultados refletem percentagens de variação em relação ao valor basal, obtido antes da administração do fármaco a testar.

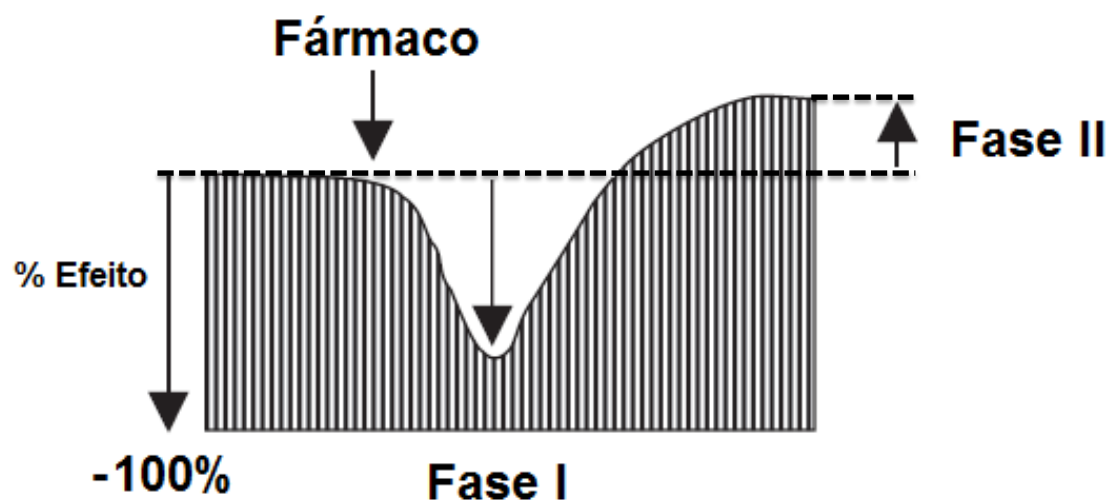


Fig. 11 – Esquema representativo da forma de cálculo do efeito inotrópico negativo (Fase I) e do efeito inotrópico positivo (Fase II) do ATP (aplicável aos restantes agonistas estudados que apresentaram um efeito bifásico semelhante). A força de contração corresponde aos valores de tensão ativa durante as duas fases, tendo em consideração a tensão ativa antes da aplicação do fármaco em estudo (100%) (Adaptado de Gergs *et al.*, 2008).

Os resultados são apresentados como média \pm S.E.M para um número n de experiências (preparações auriculares). Os resultados foram avaliados por análise de variância, tendo-se selecionado o teste ANOVA mais adequado para cada protocolo experimental. Utilizou-se o teste de Student-Newman-Keuls para efetuar comparações múltiplas emparelhadas, sempre que o teste ANOVA revelava diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$).

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Efeito dos nucleótidos de adenina (ATP e ADP) sobre a contração espontânea de aurículas isoladas de ratazana

O ATP (100 μ M), ligando endógeno da maioria dos recetores P2 (ver Figura 26, Anexos), exerceu um efeito crono- e inotrópico diferencial sobre a contração espontânea de aurículas isoladas de ratazana. A Figura 12 representa um traçado original onde é possível observar os efeitos do ATP.

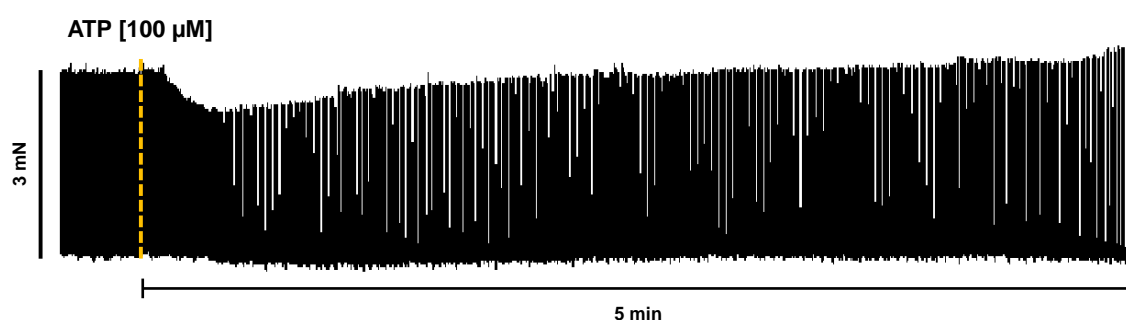


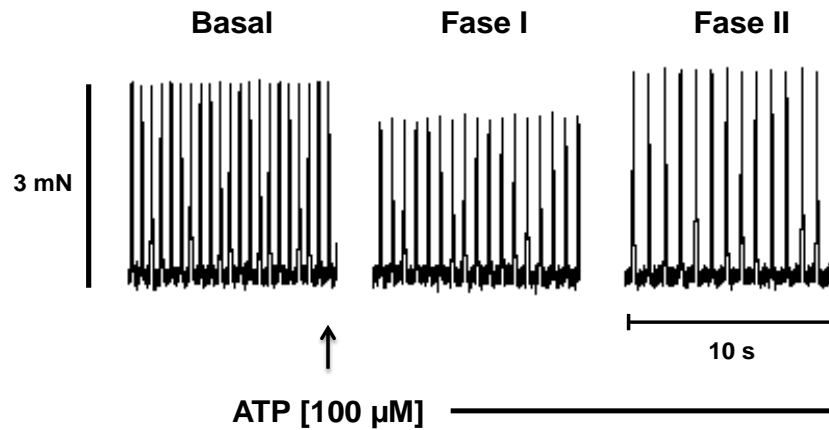
Fig. 12 – Representação do traçado original exemplificativo do efeito cronotrópico e inotrópico diferencial do ATP (100 μ M) em aurículas isoladas de ratazana a contrair espontaneamente. A linha amarela a tracejado e a escala horizontal representam o momento da aplicação e o tempo de incubação do ATP na preparação (5 minutos), respetivamente.

No que respeita ao efeito cronotrópico, após a aplicação do ATP (100 μ M) observou-se uma redução imediata e significativa ($P < 0,05$) da frequência cardíaca (Fase I; $-22 \pm 1\%$, $n=64$) que se manteve até ao final do período de incubação (Fase II; $-22 \pm 2\%$, $n=64$). O ATP (100 μ M) produziu uma redução transitória na força de contração; o efeito inotrópico negativo foi observado em menos de 1 minuto (Fase I; $-11 \pm 1\%$, $n=64$), ao qual se seguiu uma recuperação progressiva da força contrátil (Fase II; $+9 \pm 2\%$, $n=64$) que se manteve até à remoção do nucleótido. Assim, enquanto o efeito do ATP (100 μ M) sobre a frequência de contração é robusto e sustentado, o efeito verificado sobre a força contrátil é transitório (Figuras 12 e 13).

Para avaliar se os efeitos observados dependem da concentração de ATP, foram testadas de forma interpolada (com lavagem intermédia) outras duas concentrações (10 μ M e 1 mM) do nucleótido. Na concentração mais baixa (10 μ M), o ATP foi desprovido de efeito sobre as aurículas isoladas a contrair espontaneamente (resultados não apresentados). Na concentração mais elevada (1 mM) verificaram-se efeitos crono- e inotrópicos negativos exacerbados, levando muitas vezes à abolição

da atividade espontânea das preparações auriculares (resultados não apresentados). Tal pode dever-se ao potente efeito cronotrópico negativo do ATP (ver Figura 12). Tendo em consideração estes resultados, as experiências subsequentes foram realizadas com ATP aplicado na concentração de 100 μ M.

A



B

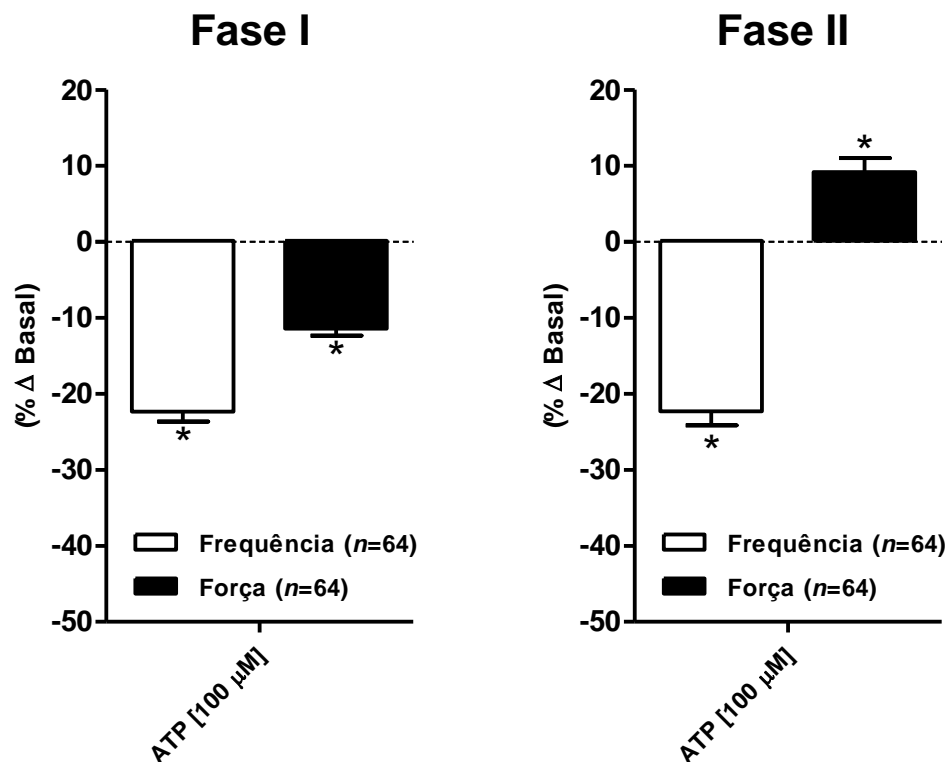


Fig. 13 – A) Representação dos traçados originais usados para a quantificação dos parâmetros avaliados (assinalado com Fase I e Fase II) durante as contrações isométricas do músculo auricular de ratazana em resposta à aplicação do ATP. **B)** Representação gráfica do efeito do ATP (100 μ M) sobre a frequência e a força de contração das aurículas isoladas de ratazana a contrair espontaneamente durante a Fase I e a Fase II. * $P < 0,05$ quando comparados com os valores de frequência e tensão basais (antes da aplicação do agonista).

A sequência de eventos observada foi consistente nas diferentes preparações auriculares estudadas. Os efeitos observados foram revertidos após lavagem e induzidos novamente após a reaplicação dos fármacos. Na concentração de 100 μM (a concentração intermédia avaliada), o efeito cronotrópico negativo do ATP observado permaneceu estável durante pelo menos 15 minutos. Esta observação sustenta a hipótese de que o cronotropismo negativo produzido pelo ATP não sofre de rápida dessensibilização, contrariamente ao recetor responsável pelo decréscimo transitório da força de contração auricular.

Os efeitos do ATP sobre a força de contração auricular encontrados neste estudo são semelhantes aos descritos por outros autores utilizando aurículas esquerdas ou direitas isoladas de ratazana (Froldi *et al.*, 1994; Froldi *et al.*, 1997; Froldi *et al.*, 2001; Froldi *et al.*, 2005; Musial *et al.*, 2012) e, também, em trabéculas de aurícula direita humana estimuladas eletricamente (Gergs *et al.*, 2008). Em todos estes estudos, incluindo o nosso, o ATP apresenta um efeito inotrópico negativo de instalação rápida, ao qual se segue um período de recuperação podendo mesmo chegar a observar-se um aumento ligeiro da força de contração auricular acima da linha de base (inotropismo positivo). No entanto, nos estudos anteriores, a quantificação do efeito inotrópico positivo foi realizada em relação aos valores obtidos durante o período de inotropismo negativo (efeito da Fase I) e não (como em nossa opinião deveria ter sido feito) em relação ao valor original antes da aplicação do nucleótido (ver Figura 11). O cálculo do efeito inotrópico na Fase II tendo como referência um valor inicial mais baixo (efeito da Fase I) realizado por outros autores aumenta “artificialmente” o valor obtido e, mais importante, faz depender o efeito medido da magnitude da resposta na Fase I, sendo que ambos os efeitos podem ser independentes (i.e. produzidos por mecanismos distintos).

Uma das possíveis limitações da utilização de aurículas isoladas a contrair espontaneamente (presente trabalho vs estudos anteriores) prende-se com a possibilidade da ocorrência de alterações na contratilidade cardíaca motivadas por alterações concomitantes da frequência; por exemplo, a redução da frequência de disparo aumenta o Ca^{2+} residual no interior da fibra miocárdica elevando a força das contrações subsequentes (Stemmer & Akera, 1986; Szigligeti *et al.*, 1996). Considerando os resultados obtidos com o ATP, verificou-se que a redução da frequência de contração inicial (Fase I) não foi acompanhada do correspondente aumento do inotropismo (na Fase I). Apesar disso, para esclarecer o possível envolvimento do efeito cronotrópico sobre a força de contração, realizaram-se experiências onde a contração auricular foi avaliada em preparações estimuladas

eletricamente (*pacing*) com uma frequência pré-definida (4 Hz), sempre superior à frequência da atividade espontânea. Desta forma, testaram-se os efeitos do ATP (0,01-1 mM) paralelamente em aurículas esquerdas estimuladas eletricamente (voltagem 200% acima do limiar de excitabilidade, de forma a recrutar todas as fibras e mimetizar o que acontece “*in vivo*”) e em aurículas direitas (contendo o nó SA) a contrair espontaneamente. O efeito bifásico do ATP (100 μ M) sobre o inotropismo auricular foi observado em ambas as situações (aurículas estimuladas e a contrair espontaneamente), sugerindo que os resultados obtidos na força de contração não parecem ser dependentes das variações sobre o cronotropismo durante ambas as fases avaliadas (resultados não apresentados).

O efeito do ADP (0,01-1 mM) foi avaliado nas mesmas condições experimentais que o ATP. O padrão de resposta obtido para o ADP foi semelhante ao observado para o ATP, embora a magnitude dos efeitos observados tenha sido globalmente menor. O ADP (100 μ M) produziu um efeito inotrópico negativo imediato (Fase I; $-5\pm 2\%$, $n=14$), seguido de um ligeiro aumento da força de contração auricular acima do valor basal (Fase II; $+7\pm 3\%$, $n=14$). O ADP (100 μ M) reduziu a frequência cardíaca durante ambos os períodos analisados, Fase I ($-20\pm 2\%$) e Fase II ($-18\pm 3\%$) ($n=14$), de forma análoga à do ATP (Figura 14). Estes efeitos foram consistentes nas diferentes preparações auriculares estudadas, tendo sido revertidos após lavagem e induzidos novamente após a reaplicação do fármaco.

Tal como o ATP, quando o ADP foi aplicado numa concentração mais elevada (1 mM) observou-se uma paragem da contração na maioria das preparações auriculares estudadas ($n=10/14$) que ocorreu imediatamente a seguir ao efeito inotrópico negativo inicial (resultados não apresentados). Sobre este aspeto os dados existentes na literatura são omissos porque a concentração máxima testada de ADP em aurículas isoladas foi de apenas 100 μ M (Froldi *et al.*, 1994). Na concentração mais baixa de ADP (10 μ M) não foram observadas alterações significativas da frequência nem da força de contração em relação aos valores auriculares basais.

Os resultados obtidos são consistentes com os dados da literatura, mostrando que o ADP produz efeitos semelhantes ao ATP sobre a contração das aurículas isoladas de ratazana (Froldi *et al.*, 1994). Também se observaram efeitos inotrópicos do ADP em miócitos embrionários de galinha (Podrasky *et al.*, 1997). Em 2006, foi levado a cabo um estudo *in vivo* em ratazanas onde se analisou o efeito da ADP-ribose, tendo sido observado que este composto exerce uma ação no coração que é independente do seu metabolito, o AMP. Foi evidenciado ainda um efeito cronotrópico negativo monofásico dependente da concentração do composto, assim como um

efeito inotrópico bifásico (inicialmente negativo seguido por positivo) (Kuz'min *et al.*, 2006).

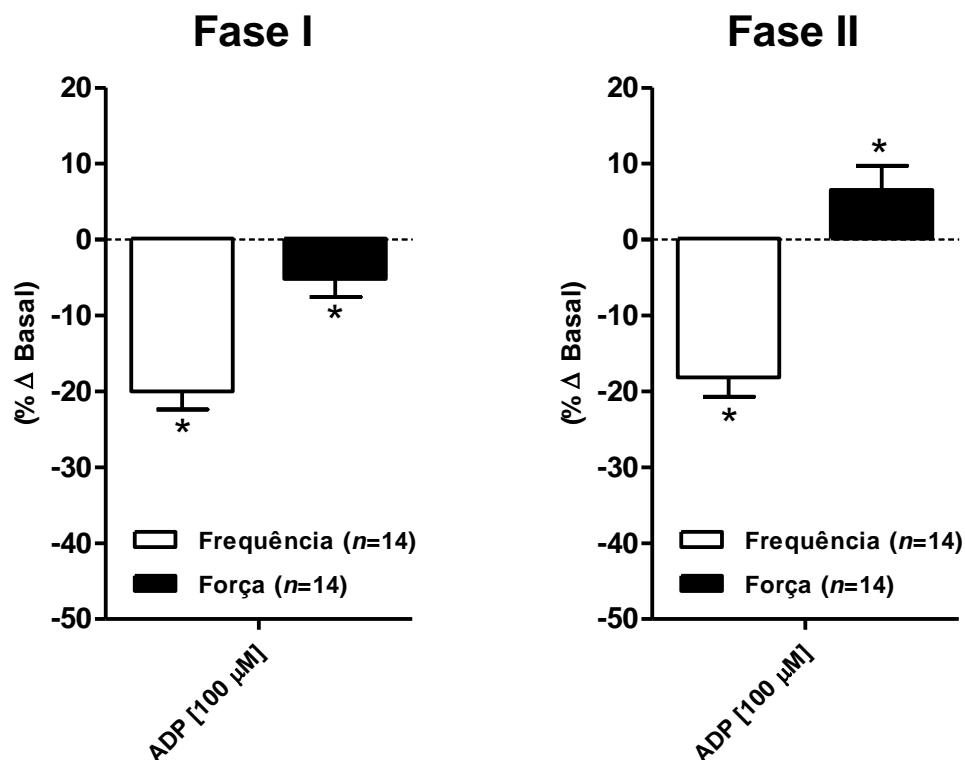


Fig. 14 – Representação gráfica do efeito do ADP (100 µM) sobre a frequência e a força de contração das aurículas isoladas de ratazana a contrair espontaneamente durante a Fase I e a Fase II. * $P < 0,05$ quando comparados com os valores de frequência e tensão basais (antes da aplicação do agonista).

Tanto em aurículas esquerdas estimuladas eletricamente (4 Hz, voltagem 200% acima do limiar de excitabilidade) como em aurículas direitas a contrair espontaneamente verificou-se que o ADP (100 µM) produz um efeito inotrópico bifásico. Os resultados obtidos sugerem, mais uma vez, que a força de contração não depende da variação da frequência cardíaca nestas condições experimentais (resultados não apresentados).

Dado que ambos os nucleótidos de adenina (ATP e ADP) exerceram efeitos semelhantes sobre as aurículas de ratazana a contrair espontaneamente, colocou-se a hipótese de que o efeito do ATP observado se poderia dever à sua metabolização em ADP e, posteriormente, em ADO pelas E-NTPDases (ver Figura 26, Anexos).

A aplicação de ADO (100 µM) produziu um efeito crono- e inotrópico negativo imediato (Fase I; $-28 \pm 2\%$, $n=15$ e $-7 \pm 2\%$, $n=15$, respetivamente) semelhante ao observado para os nucleótidos (Figura 15). Porém, durante a Fase II não foi observado qualquer aumento da força de contração auricular acima dos valores basais. Antes

pelo contrário, mantiveram-se os efeitos crono- e inotrópico negativos observados durante a Fase I ($-29 \pm 4\%$, $n=13$ e $-10 \pm 5\%$, $n=13$, respetivamente) (Figura 15).

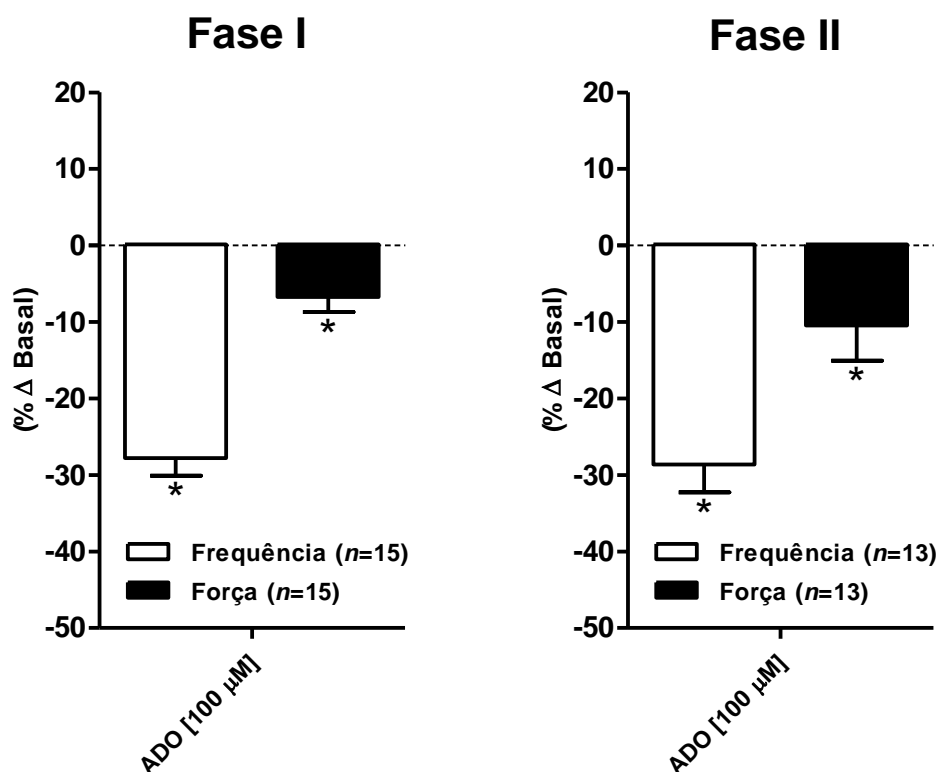


Fig. 15 – Representação gráfica do efeito da ADO (100 μM) sobre a frequência e a força de contração das aurículas isoladas de ratazana a contrair espontaneamente durante a Fase I e a Fase II. * $P < 0,05$ quando comparados com os valores de frequência e tensão basais (antes da aplicação do agonista).

O efeito inotrópico negativo da ADO observado no presente estudo (aurículas de ratazana a contrair espontaneamente) foi de menor amplitude comparativamente aos resultados obtidos previamente em aurículas esquerdas de ratazana estimuladas eletricamente (Froldi *et al.*, 1994). Por outro lado, durante a Fase II observou-se que o efeito inotrópico negativo se mantém, contrariamente ao inotropismo positivo reportado pelos mesmos autores. Esta diferença deve-se, em parte, à forma de quantificação do parâmetro avaliado por parte dos autores. Analisando pormenorizadamente os resultados apresentados naquele trabalho, pode constatar-se que a ADO em nenhuma circunstância aumenta a força de contração auricular para além do valor basal de referência medido antes da aplicação do nucleósido; existe sim, uma pequena recuperação da força de contração auricular na Fase II face ao valor medido na Fase I (Gergs *et al.*, 2009).

Curiosamente, num estudo realizado no início da década de 80 usando tecido auricular de rã, o ATP exerceu um efeito bifásico tanto na frequência como na força de

contração espontânea caracterizado por uma fase inicial crono- e inotrópica positiva seguida de uma fase negativa (Burnstock & Meghji, 1981). Os autores sugeriram que a fase positiva seria mediada por purinorecetores P2, ativados pelo ATP, enquanto a fase negativa seria mediada por purinorecetores P1, ativados pela ADO. Num estudo posterior observou-se que em aurículas de porquinho-da-índia, o ATP exercia uma ação inotrópica bifásica inversa, i.e. inicialmente negativa e posteriormente positiva (Dorigo *et al.*, 1988), tal como foi observado na ratazana; nesse estudo o efeito inotrópico negativo foi abolido pela 8-fenilteofilina, sugerindo o envolvimento de recetores do tipo P1 sensíveis à ADO. Num trabalho recente, onde se avaliou a sinalização purinérgica em aurículas isoladas de ratazanas diabéticas por injeção de estreptozotocina (Musial *et al.*, 2012), verificou-se que no grupo controlo o ATP causou um efeito inotrópico negativo seguido de um efeito inotrópico positivo, tanto na aurícula esquerda como na direita, tal como foi observado no presente trabalho. A magnitude do efeito inotrópico negativo encontrava-se reduzida na aurícula esquerda das ratazanas diabéticas com 30 dias de evolução da doença. Já o efeito cronotrópico negativo do ATP medido nos animais diabéticos se encontrava aumentado face ao que foi observado no grupo controlo. Estes resultados demonstram a existência de um interesse potencial no estudo da sinalização mediada pelos nucleótidos de adenina em situações de doença cardíaca.

O facto do ATP, o ADP e a ADO exercerem efeitos crono- e inotrópicos muito semelhantes (ordens de grandeza idênticas) sugere que parte do efeito observado do ATP se pode dever à sua metabolização em ADO por ação das E-NTPDases presentes no tecido (ver Figura 26, Anexos). Todavia, o efeito inotrópico positivo (Fase II) subsequente ao negativo (Fase I), apenas se verifica com a aplicação dos nucleótidos. Estes resultados levantam algumas questões bastantes pertinentes, tais como: (1) como é que um efeito tão rápido que ocorre em menos de um minuto (Fase I) depende de um metabolito final da cascata das E-NTPDases? (2) porque é que os efeitos crono- e inotrópicos negativos não têm a mesma ordem de grandeza? (3) qual ou quais são os mecanismos responsáveis pelos efeitos antagónicos dos nucleótidos sobre a força de contração nas duas fases de atuação de cada composto? (4) se o ATP é metabolizado em ADO qual é o composto responsável pela segunda fase do efeito do nucleótido?

Uma explicação para a existência de uma segunda fase na resposta ao ATP pode estar relacionada com variações dos níveis intracelulares de Ca^{2+} que alterem progressivamente a resposta transitória inicial. Esta última hipótese parece ir de encontro com a via de transdução de sinal descrita tipicamente para os recetores P1 e P2; o A_1AR medeia os efeitos cardíacos essencialmente através da abertura de canais

de K^+ do tipo GIRK (mecanismo rápido), enquanto a maioria dos P2YR envolve aumento do Ca^{2+} intracelular por uma cascata de eventos bioquímicos necessariamente mais lentos, não sendo de excluir nesta fase a intervenção de recetores ionotrópicos do tipo P2X (ver Introdução). Relativamente à hipótese de que os A_1AR podem ser sensíveis a nucleótidos como o ATP e o ADP, esta não pode ser facilmente eliminada com os dados existentes, tal como se verifica com o AMP (Rittiner *et al.*, 2012). Estes resultados sugerem ainda a existência de mecanismos moleculares distintos a mediar os efeitos sobre o cronotropismo e sobre o inotropismo nesta preparação, uma vez que o ATP exerceu efeitos diferentes nos dois parâmetros avaliados (ver Figura 12 e 13).

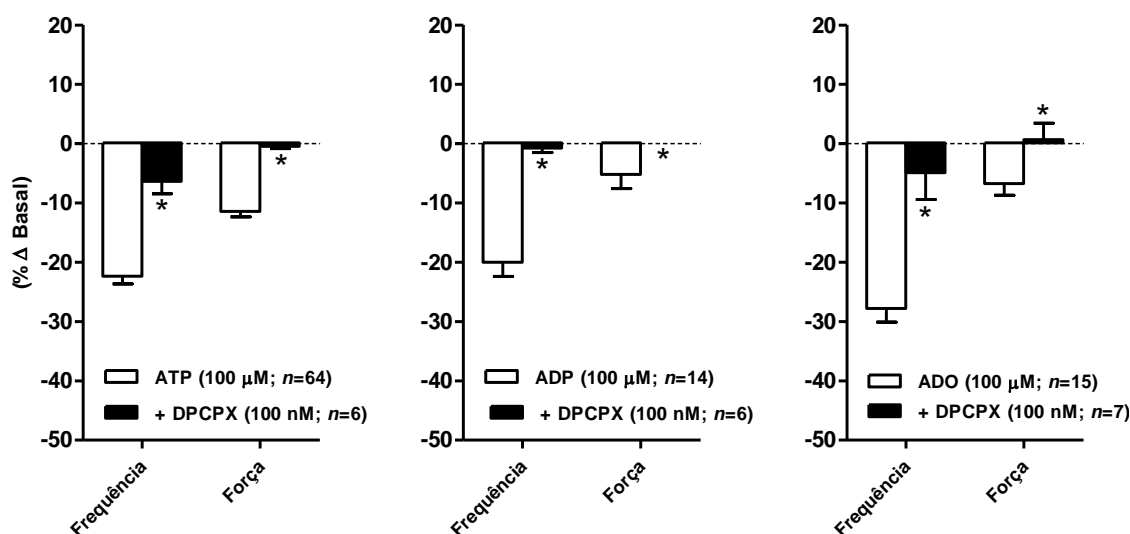
2. Influência do bloqueio dos recetores A_1 da adenosina nas respostas contráteis ao ATP, ADP e ADO em aurículas isoladas de ratazana

Em estudos prévios realizados no Laboratório de Farmacologia e Neurobiologia do ICBAS, demonstrou-se que o análogo estável da ADO e agonista dos A_1AR , R-PIA (0,001-1 μM), possuía uma atividade auricular depressora “crono-seletiva”. Isto porque o seu efeito cronotrópico negativo foi evidenciado com concentrações trinta vezes inferiores às necessárias para se observar o mesmo efeito inotrópico negativo (Bragança, 2012). Ambos os efeitos crono- e inotrópico negativos da R-PIA foram antagonizados pela DPCPX (100 nM), uma xantina com efeito antagonista seletivo sobre os A_1AR (Bruns *et al.*, 1987; Lohse *et al.*, 1987; Vahlensieck *et al.*, 1996). Tendo em consideração os resultados obtidos anteriormente com os nucleótidos e nucleósidos de adenina, o facto do ATP e ADP se hidrolisarem no meio extracelular com a formação de ADO (ver Introdução) e, ainda, a circunstância do A_1AR ser o recetor P1 mais expresso do tecido cardíaco (Headrick *et al.*, 2013), avaliou-se o efeito do ATP, ADP e ADO após o bloqueio dos A_1AR pela DPCPX (ver Figura 26, Anexos).

O pré-tratamento das preparações com DPCPX, aplicada durante 15 minutos numa concentração (100 nM) que não modificou *per se* a frequência e a força de contração auricular (e.g. Frolidi *et al.*, 1994) atenuou significativamente ($P < 0,05$) o efeito cronotrópico negativo do ATP, ADP e ADO (100 μM) (Figura 16). Relativamente à força de contração, a DPCPX (100 nM) atenuou consistentemente o efeito inotrópico negativo da ADO (100 μM). O mesmo ocorreu com o efeito inotrópico negativo do ATP e ADP, (100 μM) durante a Fase I, embora a DPCPX (100 nM) não tenha alterado o inotropismo positivo verificado na Fase II após a aplicação destes nucleótidos (Figura

16). A DPCPX (100 nM) produziu efeitos semelhantes quando os nucleótidos de adenina, ATP e ADP, foram testados em concentrações de 10 μ M e 1 mM.

Fase I



Fase II

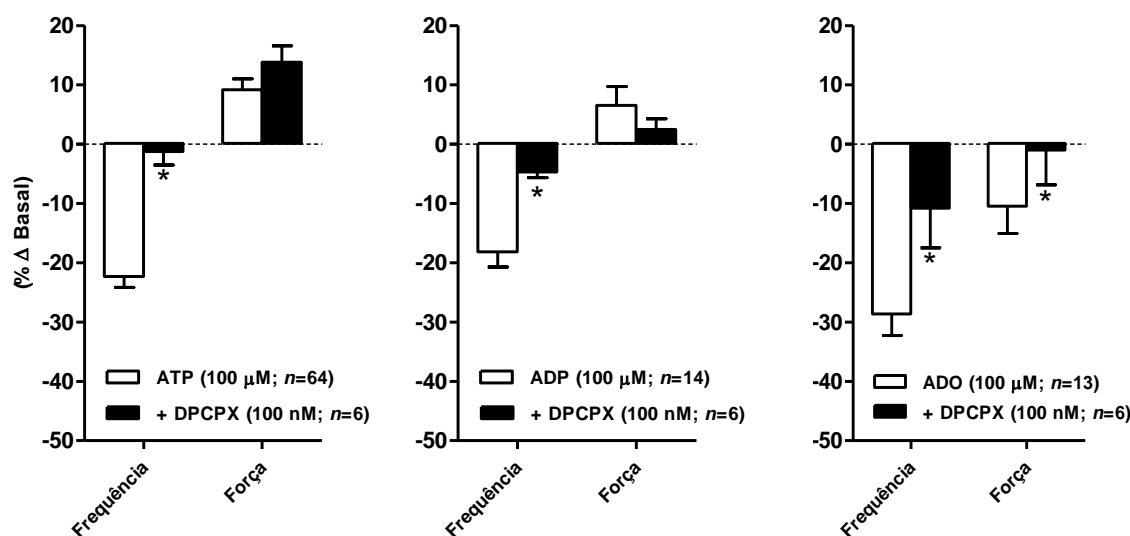


Fig. 16 – Representação gráfica do efeito do ATP, ADP e ADO (100 μ M) sobre a frequência e a força de contração das aurículas isoladas de ratazana a contrair espontaneamente durante a Fase I e a Fase II, na ausência e na presença de DPCPX (100 nM). A DPCPX foi incubada no banho 15 minutos antes da aplicação de ATP. * $P < 0,05$ quando comparados com os valores de frequência e tensão do agonista na ausência do antagonista.

Perante estes resultados é possível que os efeitos crono- e inotrópico negativos do ATP e ADP se devam, pelo menos em parte, à formação de ADO pela via das E-NTPDases, com subsequente, ativação do A_1 AR inibitório. Utilizando aurículas esquerdas de ratazana e de porquinho-da-índia estimuladas eletricamente já tinha sido observado o envolvimento de A_1 AR no efeito crono- e inotrópico negativo do

ATP (Mantelli *et al.*, 1993; Frolidi *et al.*, 1994; Musial *et al.*, 2012). Estudos realizados em miócitos ventriculares isolados e em corações intactos sugerem que os efeitos mediados pelos A₁AR estão ligados a proteínas fosfatases, ou seja, a sua ativação promove a desfosforilação de proteínas implicadas no aparelho contrátil através de mecanismos independentes do AMPc (Gupta *et al.*, 1993a; Gupta *et al.*, 1993b). Em aurículas de porquinho-da-índia observou-se que o efeito inotrópico negativo causado por nucleótidos de adenina ocorre através da regulação da condutância membranar ao K⁺, por ativação de canais acoplados a proteínas G (Bohm *et al.*, 1986). Com os dados existentes não é, contudo, possível eliminar completamente a possibilidade dos nucleótidos de adenina testados, ATP e ADP, ou do seu metabolito, AMP, ativarem diretamente os A₁AR nas aurículas de ratazana (Rittiner *et al.*, 2012).

Globalmente, estes resultados sugerem que os efeitos crono- e inotrópico negativos do ATP durante a Fase I parecem dever-se à ativação de recetores inibitórios do subtipo A₁ pela ADO formada por via das E-NTPDases ou, alternativamente, por uma ação direta dos nucleótidos sobre estes recetores sensíveis à DPCPX. Subsistem, no entanto, dúvidas em saber se a cinética de metabolização dos nucleótidos de adenina e formação de ADO é suficientemente rápida para justificar os efeitos crono- e inotrópico negativos operados pelos A₁AR na Fase I da ação dos nucleótidos. Durante a Fase II, para além do envolvimento destes recetores, parece haver a ativação de outro tipo de recetores (possivelmente P2), responsáveis por aumentar a força de contração, que se sobrepõem ao efeito inibitório mediado pelos A₁AR, tal como descrito em trabalhos anteriores (Frolidi *et al.*, 1994). No Homem, existem evidências que apontam para que tanto o efeito inotrópico negativo como o positivo causado pelo ATP possam ser independentes da ativação de A₁AR (Gergs *et al.*, 2008).

3. Papel das ecto-nucleotidases nas respostas contráteis ao ATP em aurículas isoladas de ratazana

Os nucleótidos de adenina, como o ATP e o ADP, são metabolizados no espaço extracelular por uma família de E-NTPDases que apresentam diferentes afinidades para os substratos. Esta característica, bem como as diferenças na sua distribuição tecidual, podem assumir um carácter muito relevante na acumulação de diferentes nucleótidos e nucleósidos no meio extracelular e, por via disso, regular de forma fina a sinalização purinérgica (Zimmermann, 2000).

O 6-*N,N*-dietil-D- β,γ -dibromometilenoATP (ARL67156) é um inibidor relativamente fraco das E-NTPDases; este inibidor não apresenta efeito sobre a atividade da NTPDase 2 e possui um K_i de 27 e de 112 μM respetivamente para as NTPDases 1 e 3 (Muller *et al.*, 2006). Recentemente foi descrito o efeito de uma nova classe de inibidores das E-NTPDases, os polioxometalatos, onde se inclui a POM-1, cuja potência inibitória é maior do que a do ARL67156. No coração, a POM-1 aumenta o tamanho do enfarte cardíaco após isquemia e previne os efeitos protetores do pré-condicionamento cardíaco e renal (Grenz *et al.*, 2007; Kohler *et al.*, 2007). Estes efeitos parecem resultar da diminuição do catabolismo do ATP e da formação de ADO, à qual se alocam importantes propriedades citoprotetoras.

No presente trabalho investigou-se o efeito da POM-1 (ver Figura 26, Anexos), sobre as aurículas isoladas de ratazana a contrair espontaneamente. Especificamente avaliou-se se a POM-1 ao reduzir o catabolismo extracelular do ATP modificava os seus efeitos sobre o crono- e o inotropismo auricular. Tendo em conta o valor de K_i para as diferentes isoformas destas enzimas (2,58 μM , 28,8 μM e 3,26 μM para as NTPDase 1, 2 e 3, respetivamente) usou-se uma concentração elevada de POM-1 (100 μM) com o intuito de inibir todos os subtipos de E-NTPDases presentes no tecido (Muller *et al.*, 2006).

A incubação com POM-1 (100 μM , durante 15 minutos) não modificou *per se* a frequência de contração espontânea das aurículas, mas aumentou a força de contração em $+19\pm 3\%$ ($n=8$); o efeito inotrópico positivo da POM-1 foi semelhante quer na ausência quer na presença do antagonista do $A_1\text{AR}$, DPCPX (100 nM; $n=3$; resultados não apresentados). Estes resultados estão de acordo com um estudo *in vivo* num modelo de ratinho, onde se verificou que o aumento da biodisponibilidade extracelular do ATP através da inibição das E-NTPDases pela POM-1 não alterava *per se* a frequência cardíaca (Kohler *et al.*, 2007). O efeito positivo da POM-1 sobre o inotropismo na presença de DPCPX reforça a ideia de que o ATP aumenta a força de contração auricular através da ativação de recetores P2 para nucleótidos (ver ponto 2).

Considerando que o ATP poderá exercer efeitos mistos resultantes da ativação direta de recetores P2 e/ou indiretamente por intermédio de recetores P1 pela ADO formada no meio extracelular, repetiram-se as experiências na presença de POM-1 (100 μM) associada ou não à DPCPX (100 nM). Nestas circunstâncias, a POM-1 (100 μM) aumentou significativamente ($P<0,05$) os efeitos crono- e inotrópicos negativos do ATP (100 μM) durante a Fase I (Figura 17). Na Fase II, o inibidor das E-NTPDases potenciou igualmente o efeito cronotrópico negativo do ATP (100 μM), e inverteu o efeito inotrópico positivo do nucleótido, contribuindo para prolongar o inotropismo negativo observado na Fase I (Figura 17). Estes resultados sustentam a hipótese de

que o controlo da frequência e da força de contração auricular operado por purinas é bem mais complexo do que se poderia esperar, envolvendo, muito provavelmente, a interação entre recetores P1 (do subtipo A_1) e P2 sensíveis aos nucleótidos de adenina. Nestas condições experimentais, a inibição da metabolização do ATP pela POM-1 desvenda na sua plenitude os efeitos do nucleótido sem as ações compensatórias dos seus metabolitos, ADP e ADO. Concluindo-se, portanto, que os efeitos do ATP (por via da ativação de recetores P2 de natureza ainda desconhecida) são predominantemente inibitórios, incidindo sobretudo sobre a frequência relativamente à força de contração auricular.

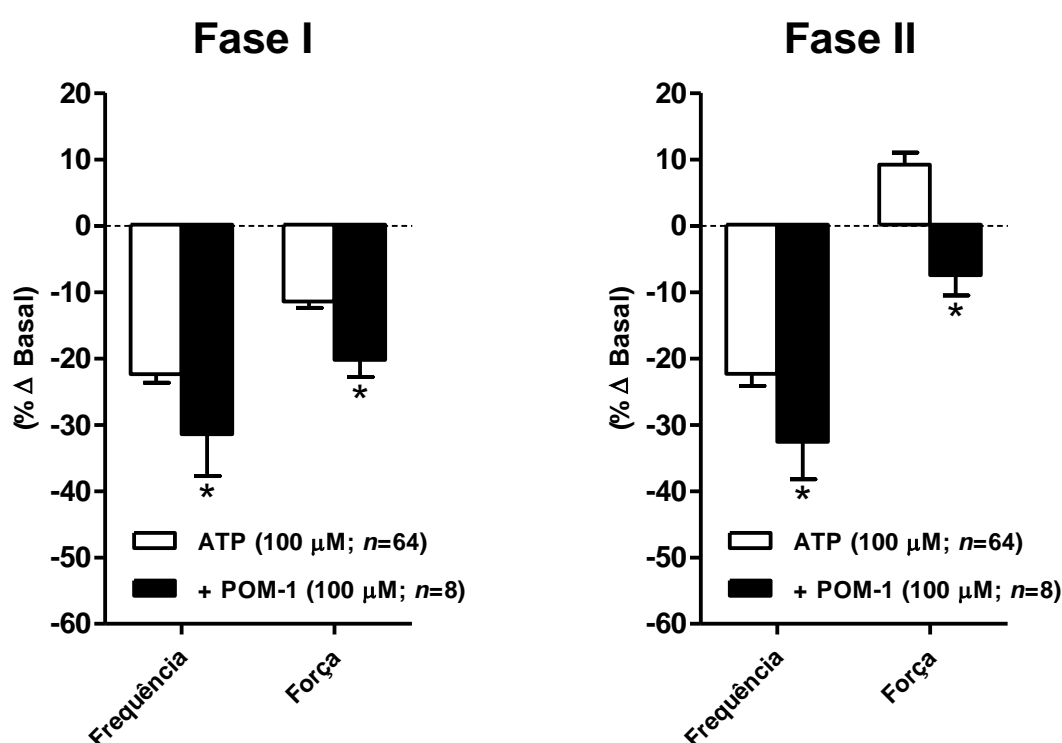


Fig. 17 – Representação gráfica do efeito do ATP (100 μM) sobre a frequência e a força de contração das aurículas isoladas de ratazana a contrair espontaneamente durante a Fase I e a Fase II, na ausência e na presença de POM-1 (100 μM). A POM-1 foi incubada no banho 15 minutos antes da aplicação de ATP. * $P < 0,05$ quando comparados com os valores de frequência e tensão do agonista na ausência do inibidor.

4. Influência da ativação e do bloqueio de recetores sensíveis ao ATP nas respostas contráteis de aurículas isoladas de ratazana

Para comprovar que o efeito do ATP nas aurículas isoladas de ratazana envolve a ativação de recetores P2, testou-se um análogo estável do ATP, o α,β -meATP (ver Figura 26, Anexos), com ação predominante sobre os P2X1R, P2X3R e P2X2/3R (Ralevic & Burnstock, 1998; Kwon, 2012). Este fármaco possui

estruturalmente uma modificação que impede a sua metabolização enzimática em ADO, e, portanto, o envolvimento de A₁AR (Jacobson, 2010). A incubação com α,β -meATP (100 μ M) não alterou o crono- e o inotropismo de forma significativa durante a Fase I ($-3\pm 14\%$, $n=2$ e $-2,2\pm 0,8\%$, $n=2$, respetivamente), mas aumentou a frequência de contração ($P<0,05$) sem alterar a força contrátil ($+18\pm 3\%$, $n=2$ e $+6\pm 1\%$, $n=2$, respetivamente) durante a Fase II (Figura 18). Curiosamente, em estudos anteriores o α,β -meATP aumentou a força de contração de forma gradual em aurículas esquerdas estimuladas eletricamente, tendo atingindo a resposta máxima aos 10-15 minutos de aplicação (Froldi *et al.*, 1994). O número reduzido de experiências efetuadas ($n=2$) com este análogo do ATP impede a retirada de conclusões mais definitivas sobre a ação deste composto no coração.

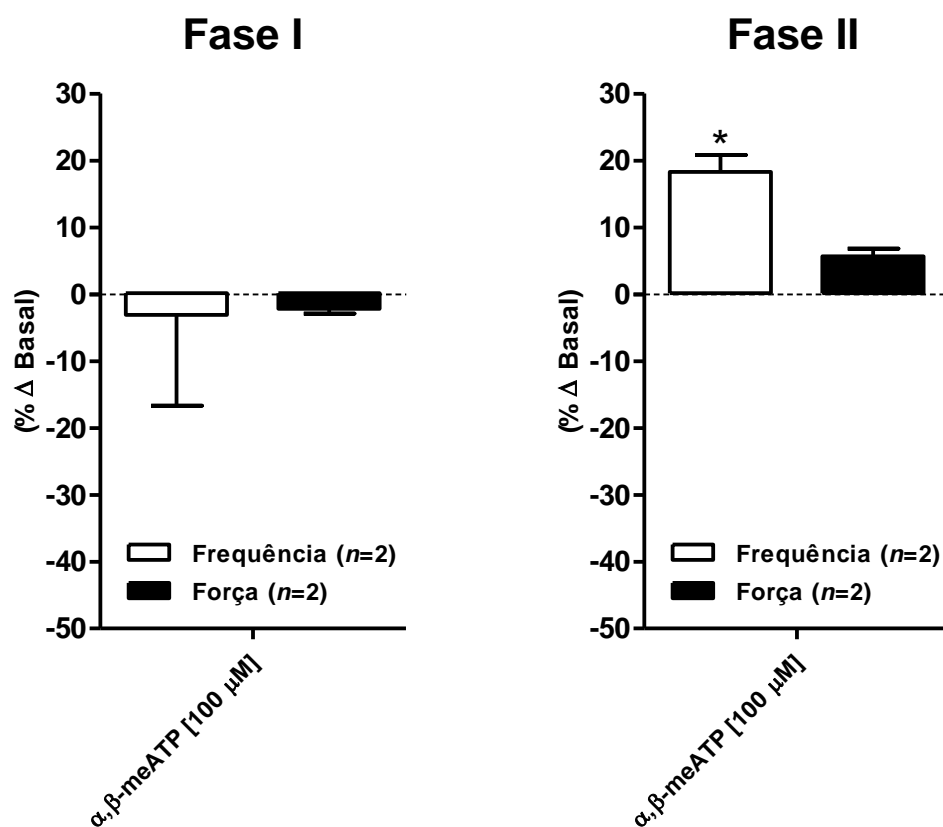


Fig. 18 – Representação gráfica do efeito do α,β -meATP (100 μ M) sobre a frequência e a força de contração das aurículas isoladas de ratazana a contrair espontaneamente durante a Fase I e a Fase II. * $P < 0,05$ quando comparados com os valores de frequência e tensão basais (antes da aplicação do agonista).

De forma a consolidar os resultados obtidos utilizou-se outro análogo estável do ATP e agonista não seletivo dos recetores P2, o ATP γ S (ver e.g. Duarte-Araújo *et al.*, 2009) (ver Figura 26, Anexos). O ATP γ S (100 μ M) produziu uma diminuição imediata da frequência cardíaca (Fase I; $-22\pm 3\%$, $n=15$) que se manteve numa magnitude semelhante até ao final do período de incubação (Fase II; $-16\pm 4\%$, $n=15$)

(Figura 19). Relativamente à força de contração, verificou-se um ligeiro efeito inotrópico negativo inicial (Fase I; $-5\pm 2\%$, $n=15$) que não foi estatisticamente significativo ($P>0,05$), seguido de um inotropismo positivo sustentado (Fase II; $+19\pm 7\%$, $n=15$) (Figura 19). A magnitude do efeito inotrópico positivo do ATP γ S (100 μ M) foi superior ao verificado para o ATP (100 μ M). Os efeitos do ATP γ S (1 μ M, 10 μ M e 30 μ M) foram dependentes da concentração utilizada (resultados não apresentados).

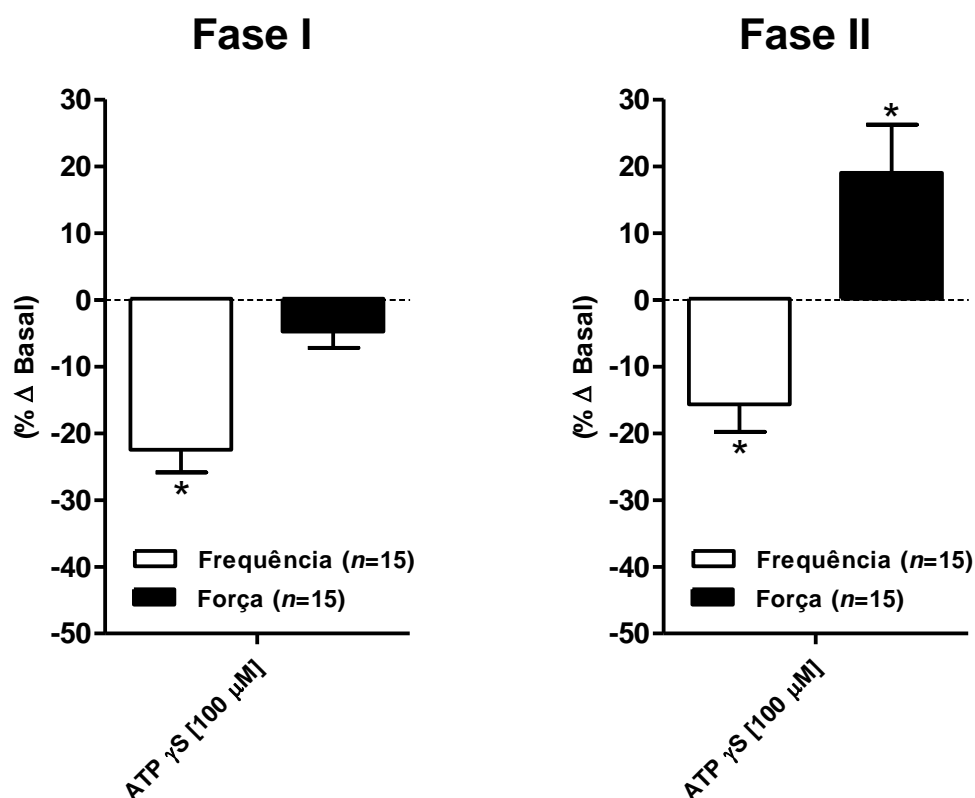


Fig. 19 – Representação gráfica do efeito do ATP γ S (100 μ M) sobre a frequência e a força de contração das aurículas isoladas de ratazana a contrair espontaneamente durante a Fase I e a Fase II. * $P < 0,05$ quando comparados com os valores de frequência e tensão basais (antes da aplicação do agonista).

O efeito do ATP γ S (1-100 μ M, $n=6-7$) sobre a força de contração foi também avaliado em aurículas esquerdas estimuladas eletricamente (*pacings* elétrico, 4 Hz, voltagem 200% acima do limiar de excitabilidade) tendo sido semelhante ao observado nas aurículas (esquerda e direita) a contrair espontaneamente. Estes resultados reforçam a ideia de que nestas condições experimentais a força de contração não parece ser afetada significativamente por variações na frequência de contração auricular. Os dados obtidos com este agonista sugerem o envolvimento de recetores P2 inibitórios sensíveis ao ATP γ S, para além dos A₁AR, no controlo do cronotropismo em aurículas isoladas de ratazana (ver ponto 2).

Na sequência dos resultados obtidos com os agonistas dos recetores P2 testou-se o efeito do ATP na presença de PPADS e suramina (10 μ M), dois antagonistas não seletivos destes recetores (Jacobson, 2010) (ver Figura 26, Anexos), sobre a atividade das aurículas isoladas de ratazana a contrair espontaneamente. Ambos os antagonistas foram aplicados 15 minutos antes do ATP numa concentração (10 μ M) que não modificou *per se* a frequência e a força de contração auricular. O PPADS atenuou ($P<0,05$) o efeito cronotrópico negativo do ATP (100 μ M) durante as Fases I e II (Figura 20). Contrariamente, este antagonista potenciou ligeiramente o efeito inotrópico negativo inicial do ATP (100 μ M) e inverteu o efeito inotrópico positivo observado na Fase II (Figura 20). Por seu lado, a suramina inverteu somente o efeito inotrópico positivo do ATP da Fase II (Figura 20), tal como verificado previamente por outros autores em aurículas esquerdas estimuladas eletricamente (Froldi *et al.*, 1994).

Sabendo, que o PPADS na concentração testada (10 μ M) se comporta como um antagonista P2X preferencial (Erlinge & Burnstock, 2008; Jacobson, 2010), estes resultados sugerem o envolvimento de P2XR no efeito cronotrópico negativo do ATP a par do efeito mediado pelos A_1 AR resultante da conversão de ATP em ADO pelas E-NTPDases (ver Figura 16). Os resultados reforçam, ainda, a hipótese de que o efeito do ATP sobre a força de contração se deve ao balanço entre a ativação de P2XR (ativados pelo ATP γ S) com propriedades inotrópicas positivas e de A_1 AR (sensíveis à DPCPX) com efeito inotrópico negativo (ver ponto 2).

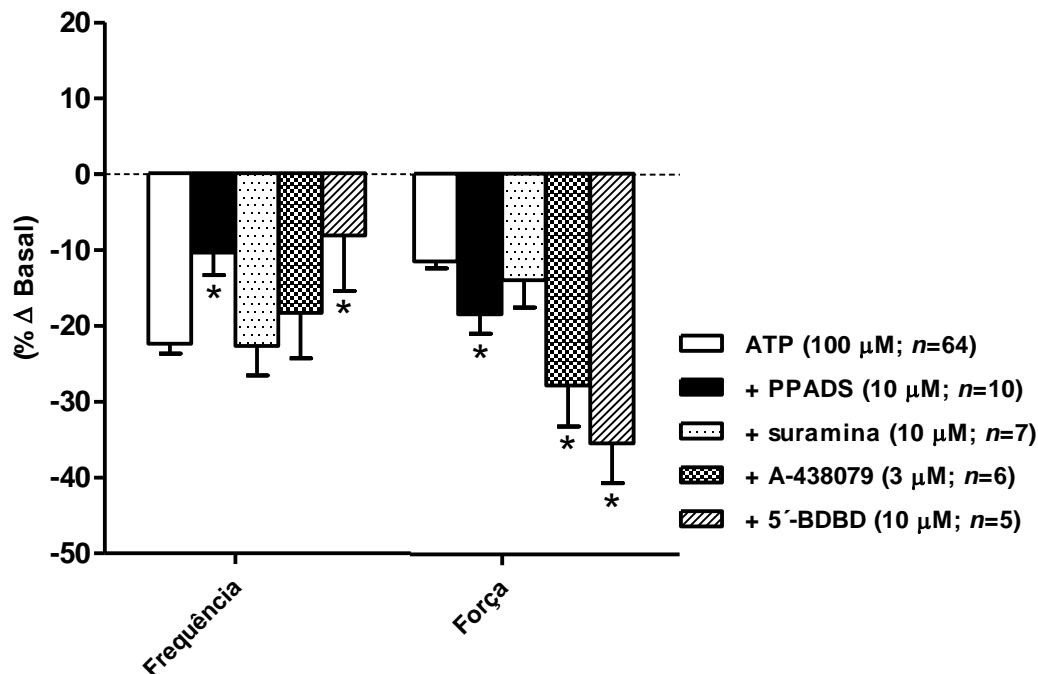
A participação de P2XR no efeito inotrópico positivo do ATP já foi observada por outros autores (Froldi *et al.*, 1994; Mei & Liang, 2001). Uma vez que os P2X1R, P2X3R e P2X2/3R ativados pelo α,β -meATP são recetores facilmente dessensibilizáveis e, portanto, incompatíveis com o efeito sustentado do ATP e do ATP γ S sobre o inotropismo auricular (Fase II), averiguámos a contribuição de outros recetores P2X recorrendo a antagonistas seletivos.

O P2X5R é o recetor mais expresso no tecido cardíaco (Musa *et al.*, 2009). No entanto, a ausência de ferramentas farmacológicas, nomeadamente de agonistas e antagonistas seletivos, dificultou a tarefa para avaliar o envolvimento deste recetor no efeito inotrópico do ATP. A contribuição do P2X5R pode ser considerada tendo em conta a inversão do efeito inotrópico positivo do ATP pela suramina, já que esta apresenta afinidade ($pEC_{50}=5,4$) para o bloqueio deste recetor (Jacobson, 2010). Todavia, não é possível excluir totalmente o envolvimento de P2YR também bloqueáveis pela suramina (10 μ M) (Erlinge & Burnstock, 2008; Jacobson, 2010).

Devido àquele constrangimento no estudo do P2X5R resolveu-se explorar o papel de outros P2XR expressos no tecido cardíaco e com efeitos cardíacos documentados, nomeadamente o P2X7R (Barth *et al.*, 2010; Vasileiou *et al.*, 2010;

Vessey *et al.*, 2011) e o P2X4R (Hu *et al.*, 2001; Hu *et al.*, 2002; Shen *et al.*, 2006; Yang & Liang, 2012).

Fase I



Fase II

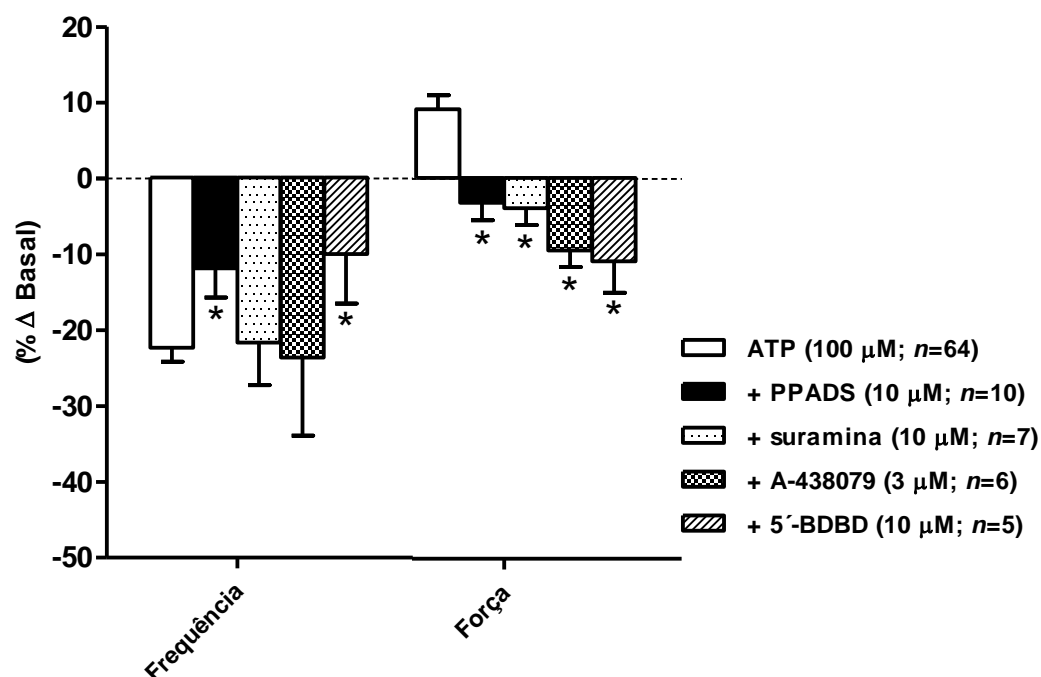


Fig. 20 – Representação gráfica do efeito do ATP (100 μM) sobre a frequência e a força de contração das aurículas isoladas de ratizona a contrair espontaneamente durante a Fase I e a Fase II, na ausência e na presença de PPADS (10 μM), suramina (10 μM), A-438079 (3 μM) ou de 5'-BDBD (10 μM). Os antagonistas foram incubados no banho 15 minutos antes da aplicação de ATP. *P < 0,05 quando comparados com os valores de frequência e tensão do agonista na ausência do antagonista.

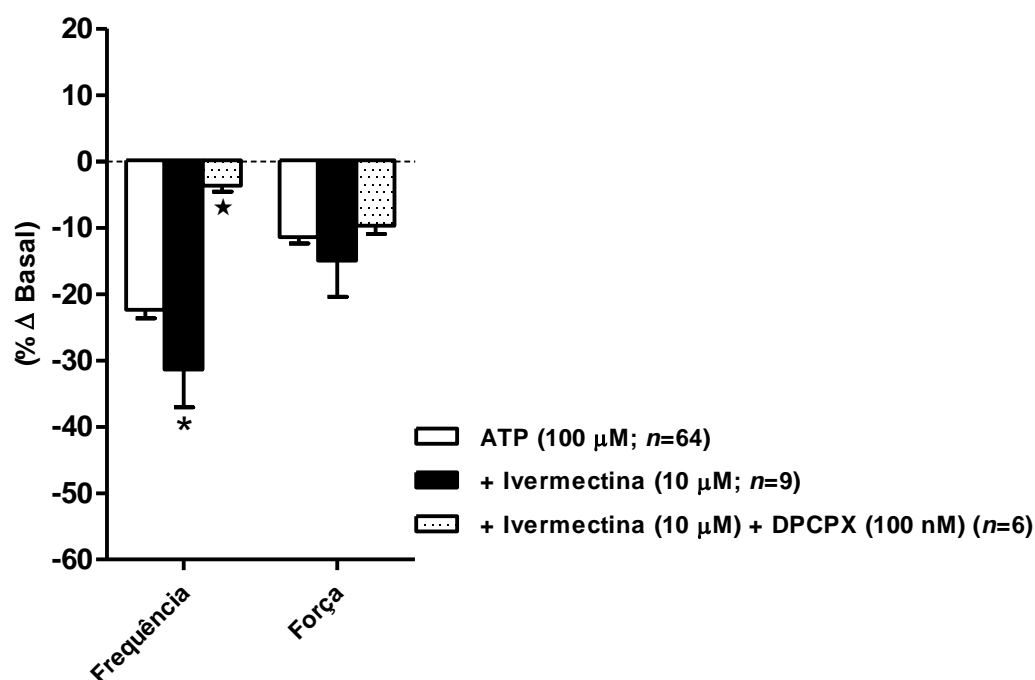
O antagonista seletivo do P2X7R, A-438079 (3 μ M) (Jacobson, 2010) (ver Figura 26, Anexos), não alterou *per se* a frequência e a força de contração auricular. No entanto, este antagonista favoreceu o efeito inotrópico negativo do ATP tanto na Fase I como na Fase II, sem alterar o efeito cronotrópico negativo sustentado do nucleótido (Figura 20).

No que respeita ao antagonista seletivo do P2X4R (5'-BDBD) (ver Figura 26, Anexos), a experiência com este fármaco é limitada e não existe até ao momento consenso relativamente ao intervalo de concentrações necessárias para bloquear estes recetores (Balazs *et al.*, 2013); já foram usadas tanto concentrações baixas (5-10 μ M) como elevadas (30-100 μ M) deste composto para o mesmo fim. Tendo em conta o valor de IC₅₀ (0,50 μ M) do 5'-BDBD (Jacobson, 2010; Balazs *et al.*, 2013) e os relatos sobre a utilização deste fármaco em estudos anteriores (Kwon, 2012), usou-se no presente trabalho uma concentração intermédia (10 μ M) que *per se* diminuiu a frequência e a força de contração em cerca de 30% do valor controlo. Tendo este resultado em consideração, pode colocar-se a hipótese de que o bloqueio do P2X4R pelo 5'-BDBD contraria o tónus contraturante endógeno do ATP nas aurículas isoladas de ratazana a contrair espontaneamente. Tal como o antagonista do P2X7R, o 5'-BDBD (10 μ M) potenciou o efeito inotrópico negativo do ATP (100 μ M), mas contrariamente ao primeiro atenuou o cronotropismo negativo do mesmo (Figura 20).

Para investigar melhor o envolvimento do P2X4R, testou-se o efeito da ivermectina (10 μ M), um modulador alostérico positivo deste recetor (Priel & Silberberg, 2004; Jacobson, 2010) (ver Figura 26, Anexos), que não modificou *per se* a frequência e a força de contração das aurículas a contrair espontaneamente. A ivermectina (10 μ M) potenciou o efeito cronotrópico negativo do ATP (100 μ M) nas Fases I e II, sem alterar significativamente ($P>0,05$) o efeito do nucleótido sobre o inotropismo (Figura 21). Relativamente ao efeito do P2X4R sobre a frequência de contração auricular, estes resultados são concordantes com os obtidos na presença do antagonista seletivo dos P2X4R, o 5'-BDBD (10 μ M). Assim, parece existir um envolvimento dos P2X4R no efeito cronotrópico negativo do ATP (100 μ M), que a par dos A₁AR contribuem para a redução da frequência cardíaca observada (ver ponto 2).

Parece existir uma interligação entre a ativação dos P2X4R e A₁AR, já que a aplicação conjunta de ivermectina (10 μ M) e do antagonista dos A₁AR, DPCPX (100 nM), preveniu o efeito cronotrópico negativo do ATP (100 μ M), sem alterar o efeito do nucleótido sobre a força de contração nas Fase I e II (Figura 21). O mesmo foi observado quando o análogo estável do ATP, ATP γ S (100 μ M), foi testado na presença do antagonista A₁AR, DPCPX (100 nM) (Figura 22).

Fase I



Fase II

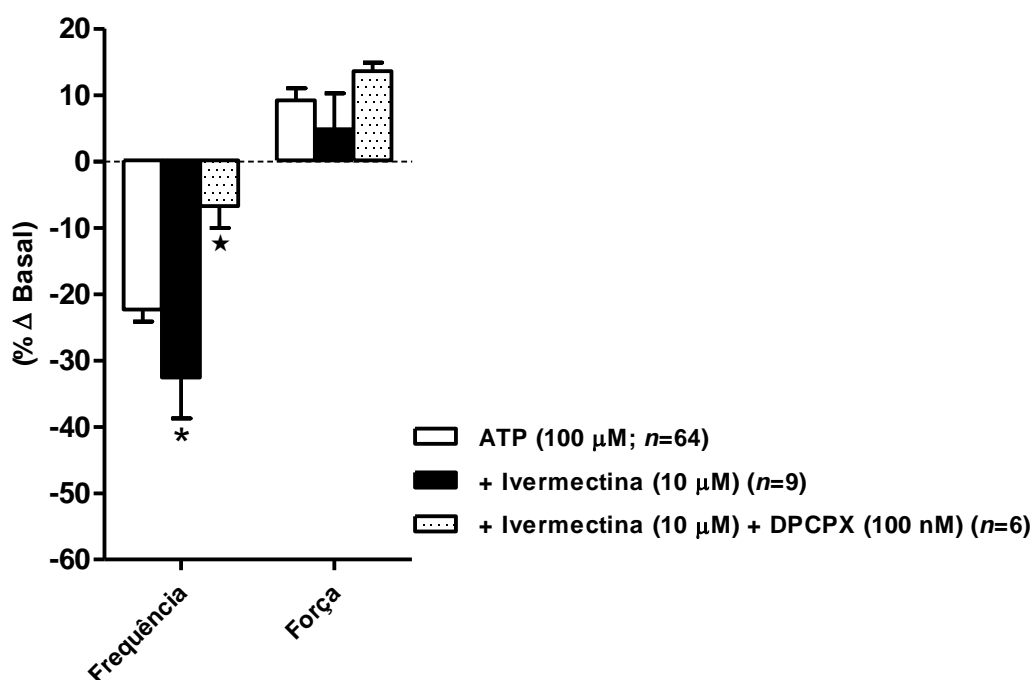


Fig. 21 – Representação gráfica do efeito do ATP (100 μ M) sobre a frequência e a força de contração das aurículas isoladas de ratazana a contrair espontaneamente durante a Fase I e a Fase II, na ausência e na presença de ivermectina (10 μ M) e ivermectina (10 μ M) + DPCPX (100 nM). A DPCPX foi incubada no banho 15 minutos antes da aplicação da ivermectina. A ivermectina foi incubada 15 minutos antes da aplicação de ATP. * $P < 0,05$ quando comparados com os valores de frequência e tensão do agonista na ausência do modulador alostérico. * $P < 0,05$ quando comparados com os valores de frequência e tensão do modulador alostérico.

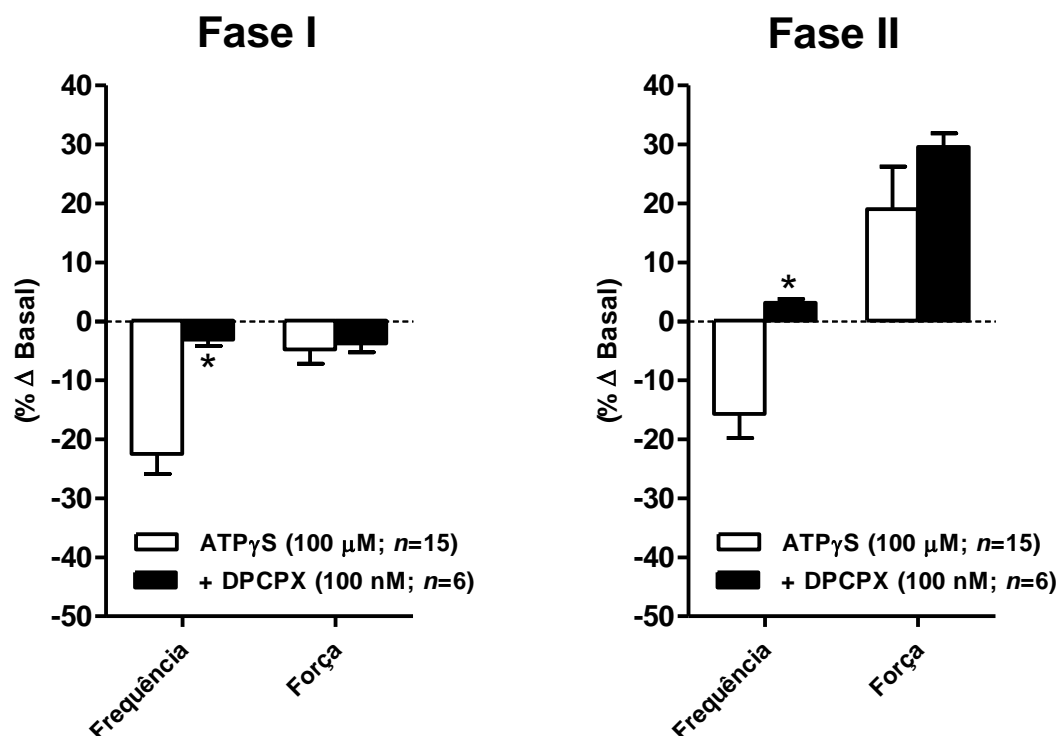


Fig. 22 – Representação gráfica do efeito do ATP γ S (100 μ M) sobre a frequência e a força de contração das aurículas isoladas de ratazana a contrair espontaneamente durante a Fase I e a Fase II, na ausência e na presença de DPCPX (100 nM). A DPCPX foi incubada no banho 15 minutos antes da aplicação de ATP γ S. * $P < 0,05$ quando comparados com os valores de frequência e tensão do agonista na ausência do antagonista.

Haverá, hipoteticamente, uma cooperação ainda mal definida entre os P2X4R e os A $_1$ AR que permita explicar o fato do efeito cronotrópico negativo do ATP depender da ativação dos dois recetores (Figuras 20 e 21), sendo que o efeito do nucleótido se perde quase por completo após o bloqueio do A $_1$ AR (ver Figura 16). Nestas circunstâncias o efeito cronotrópico negativo do análogo estável do ATP, ATP γ S (100 μ M), também foi prevenido na presença do antagonista do A $_1$ AR, DPCPX (100 nM) (Figura 22). O bloqueio da atividade do P2X4R na presença do antagonista do A $_1$ AR sugere a existência de uma interação física muito próxima entre os dois recetores, tal como acontece nos fenómenos de oligomerização. Serão, no entanto, necessários estudos adicionais (e.g. ensaios de imunolocalização, co-imunoprecipitação e / ou *Fluorescence resonance energy transfer* – FRET) para avaliar se existe entre estes recetores fenómenos de heterodimerização.

Contrariamente ao que se observou na presença do 5'-BDBD (10 μ M) e do A-438079 (3 μ M), respetivamente antagonistas dos P2X4R e P2X7R, a ativação alostérica do P2X4R com a ivermectina (10 μ M) não modificou o efeito do ATP (100 μ M) sobre a força de contração nas Fase I e II, tanto na ausência como na presença do antagonista do A $_1$ AR, DPCPX (100 nM) (Figura 21). Esta aparente incoerência

entre os efeitos do antagonista e do modulador alostérico dos P2X4R, respetivamente 5'-BDBD (10 μ M) e ivermectina (10 μ M), apontam para que o efeito inotrópico positivo do ATP seja possivelmente mediado por recetores do subtipo P2X7 sensíveis ao A-438079. É, portanto, possível que a entrada de iões Ca^{2+} através do recetor ionotrópico P2X7 contrarie o efeito negativo que a ativação dos A_1AR exerce sobre a força de contração, justificando o facto de o ATP (100 μ M) produzir um maior efeito inibitório na presença do A-438079 (3 μ M) (ver Figura 20). Importa, todavia, referir que o fenómeno de excitação-contração de uma célula cardíaca não depende exclusivamente da acumulação intracelular de Ca^{2+} , dependendo de outros fatores, como a sensibilidade dos miofilamentos a este catião.

Em suma, os resultados evidenciam o envolvimento de P2X4R no efeito cronotrópico negativo causado pelo ATP em ambas as fases de avaliação, Fases I e II, e permitem justificar os efeitos do nucleótido sobre a frequência de contração auricular na presença do inibidor das E-NTPDases, POM-1 (100 μ M) (Figura 17), assim como do seu análogo estável, ATP γ S (100 μ M) (Figura 19). Já no que respeita ao efeito do nucleótido sobre a força de contração auricular, este parece ser devido predominantemente à ativação de P2X7R (Figura 20). Embora os P2X7R sejam expressos em cardiomiócitos auriculares de ratinho (Barth *et al.*, 2010), não existem dados na literatura sobre o seu papel no controlo da frequência e da força de contração auricular. Os dados obtidos neste trabalho não permitem excluir completamente a participação de P2X4R no efeito inotrópico positivo do ATP (Hu *et al.*, 2002). A sobreexpressão deste recetor promove a contratilidade miocárdica (Hu *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2004). Em miócitos ventriculares de ratinho, o análogo do ATP, 2-meSATP, aumentou uma corrente catiónica não seletiva, insensível à suramina e ao PPADS (Mei & Liang, 2001). Além disso, a caracterização do efeito do 2-meSATP em cardiomiócitos sobreexpressando o P2X4R mostrou que o aumento da resposta contrátil dos miócitos não foi acompanhado de qualquer alteração na corrente dos canais de Ca^{2+} tipo L. Esta observação, juntamente com a ausência de despolarização em resposta ao 2-meSATP, indica que não há fluxo de Ca^{2+} através destes canais durante a ativação do recetor (Shen *et al.*, 2007).

5. Influência do bloqueio do recetor P2Y₁ nas respostas contráteis ao ADP em aurículas isoladas

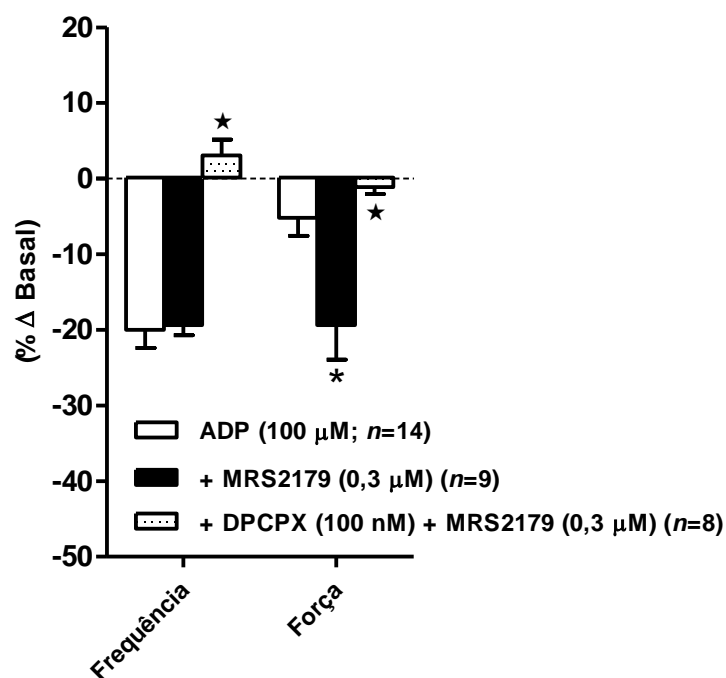
Como referido anteriormente, o ATP e o ADP exerceram efeitos crono- e inotrópicos muito semelhantes (ver Figura 13 e 14, respetivamente). Para além de se

verificar que parte do efeito dos nucleótidos se deve à ativação de A₁AR (ver Figura 16), resultante da sua metabolização em ADO por via das E-NTPDases, pareceu também importante investigar o papel do recetor metabotrópico P2Y₁ na contratilidade auricular, por este recetor ser sensível aos dois nucleótidos avaliados, ATP e ADP (ver Figura 26, Anexos). O antagonista seletivo dos P2Y₁R, MRS2179 (0,3 µM), não modificou *per se* a frequência e a força de contração auricular. O bloqueio do P2Y₁R potenciou o efeito inotrópico negativo rápido (Fase I) do ADP (100 µM) e reduziu a recuperação deste mesmo efeito para os níveis basais (Fase II) (Figura 23). O MRS2179 (0,3 µM) não alterou de forma significativa ($P > 0,05$) o cronotropismo negativo induzido pelo ADP (100 µM) (Figura 23).

Curiosamente, as respostas do nucleótido na presença do MRS2179 (0,3 µM) foram muito semelhantes às observadas após o tratamento com o antagonista dos P2X₇R, A-438079 (3 µM) (ver Figura 20), sugerindo que ambos os recetores, P2X₇ e P2Y₁, parecem estar envolvidos no aumento da força de contração auricular respetivamente do ATP e do ADP. O efeito inotrópico final observado após a aplicação de ATP ou ADP resulta, então, do balanço entre a ativação dos P2X₇R / P2Y₁R, cuja atividade inotrópica positiva é, em parte, contrariada pela ativação de A₁AR pela ADO gerada extracelularmente por via das E-NTPDases. Num estudo realizado em células marcapasso de sapo verificou-se que os P2Y₁R são capazes de modular a libertação de Ca²⁺ a partir das reservas do retículo sarcoplasmático (Ju *et al.*, 2003), ao contrário do que foi verificado no músculo liso (MacMillan *et al.*, 2012), justificando o efeito inotrópico positivo observado.

Muitos têm sido os estudos que mostram uma interação entre os P2Y₁R e A₁AR (Yoshioka *et al.*, 2001; Yoshioka *et al.*, 2002; Nakata *et al.*, 2005). Porém, nenhum destes estudos utiliza tecido cardíaco como preparação experimental, já que a expressão cardíaca do P2Y₁R na ratazana parece pouco relevante (Musa *et al.*, 2009). Neste trabalho avaliaram-se os efeitos do ADP (100 µM) após a aplicação conjunta de MRS2179 (0,3 µM) e DPCPX (100 nM). Os antagonistas P2Y₁R e A₁AR preveniram o efeito do ADP (100 µM) sobre a contração espontânea das aurículas isoladas de ratazana (Figura 23). Estes resultados reforçam a hipótese de que existe antagonismo entre as ações dos A₁AR e P2Y₁R, cuja atividade pode ser abolida na presença de DPCPX (100 nM). Portanto, estudos adicionais serão necessários para confirmação desta hipótese.

Fase I



Fase II

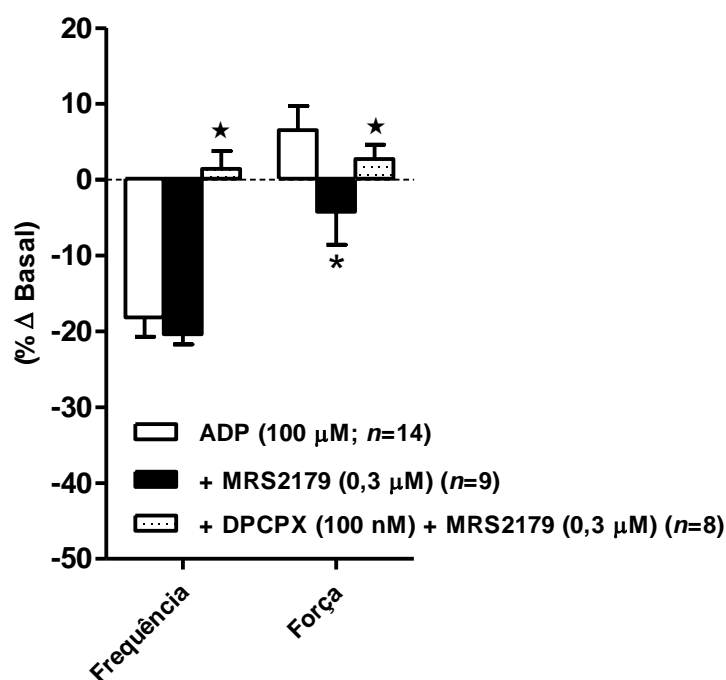


Fig. 23 – Representação gráfica do efeito do ADP (100 μM) sobre a frequência e a força de contração das aurículas isoladas de ratazana a contrair espontaneamente durante a Fase I e a Fase II, na ausência e na presença de MRS2179 (0,3 μM) e de MRS2179 (0,3 μM) + DPCPX (100 nM). A DPCPX foi incubada no banho 15 minutos antes da aplicação do MRS2179. O MRS2179 foi incubado 15 minutos antes da aplicação de ATP. **P* < 0,05 quando comparados com os valores de frequência e tensão do agonista na ausência do antagonista. **P* < 0,05 quando comparados com os valores de frequência e tensão do agonista na presença do antagonista MRS2179.

6. Efeito dos nucleótidos de uracilo (UTP e UDP) sobre a contração espontânea de aurículas isoladas de ratazana

Neste trabalho investigou-se, ainda, o efeito dos nucleótidos de uracilo, UTP e UDP, sobre a contração espontânea das aurículas de ratazana, com o objetivo de avaliar o papel dos recetores P2Y₂, P2Y₄ ou P2Y₆ na atividade contrátil auricular (ver Figura 26, Anexos). A incubação com UTP (100 µM) aumentou ligeiramente a força de contração auricular na Fase II de avaliação da atividade, sem afetar significativamente a frequência de contração auricular (Figura 24). O efeito do UTP foi dependente da concentração (0,01-1 mM). Na concentração máxima utilizada (1 mM), o UTP aumentou o inotropismo auricular em 16±8% (*n*=3; resultados não apresentados). Contrariamente ao observado com o UTP, a incubação com UDP (0,01-1 mM) não alterou significativamente nenhum dos parâmetros avaliados (força e frequência de contração) (Figura 24).

Os resultados das experiências com os nucleótidos de uracilo sugerem que os recetores P2Y₂ ou P2Y₄ exercem efeitos modestos sobre a contração auricular, podendo eventualmente contribuir para o reforço do efeito inotrópico positivo do ATP na Fase II. O efeito do UTP sobre a força de contração auricular está em concordância com os relatos existentes na literatura para aurículas esquerdas de ratinho (Froldi *et al.*, 1994; Froldi *et al.*, 1997; Froldi *et al.*, 2001) e de porquinho-da-índia (Froldi *et al.*, 1997) estimuladas eletricamente. O mesmo foi observado no coração de ratazana (e.g. aurícula esquerda, tiras de ventrículo direito e músculos papilares de ventrículo esquerdo) (Froldi *et al.*, 2005). O UTP aumenta a contratilidade de miócitos ventriculares de galinha em cultura através do aumento dos níveis de IP₃ (Podrasky *et al.*, 1997) e de Ca²⁺ no meio intracelular (Froldi *et al.*, 1997). Foi também sugerido que o inotropismo positivo observado para o UTP dependia da ativação da fosfolipase A₂ e da libertação de prostanóides (Froldi *et al.*, 2005).

A ausência de efeito do UDP nas aurículas isoladas de ratazana (este trabalho) contraria os dados existentes na literatura, na medida em que se verificou que o UDP possui um efeito inotrópico auricular (Musial *et al.*, 2012) mediado pela ativação de P2Y₆R sensíveis ao MRS2578 (Wihlborg *et al.*, 2006). Considerando a ausência de efeito do UDP (agonista dos P2Y₆R) e da suramina, antagonista P2 com maior afinidade para recetores do subtipo P2Y₂, é provável que este recetor esteja envolvido, ainda que parcialmente na resposta inotrópica positiva do UTP (e ATP) nas aurículas isoladas de ratazana a contrair espontaneamente. Será necessário, no entanto, realizar estudos com agonistas e antagonistas seletivos destes recetores ou ensaios

para avaliar a expressão dos subtipos de recetores P2 sensíveis aos nucleótidos de uracilo, para afirmar com mais certeza o grau de envolvimento de cada um destes recetores na contratilidade auricular.

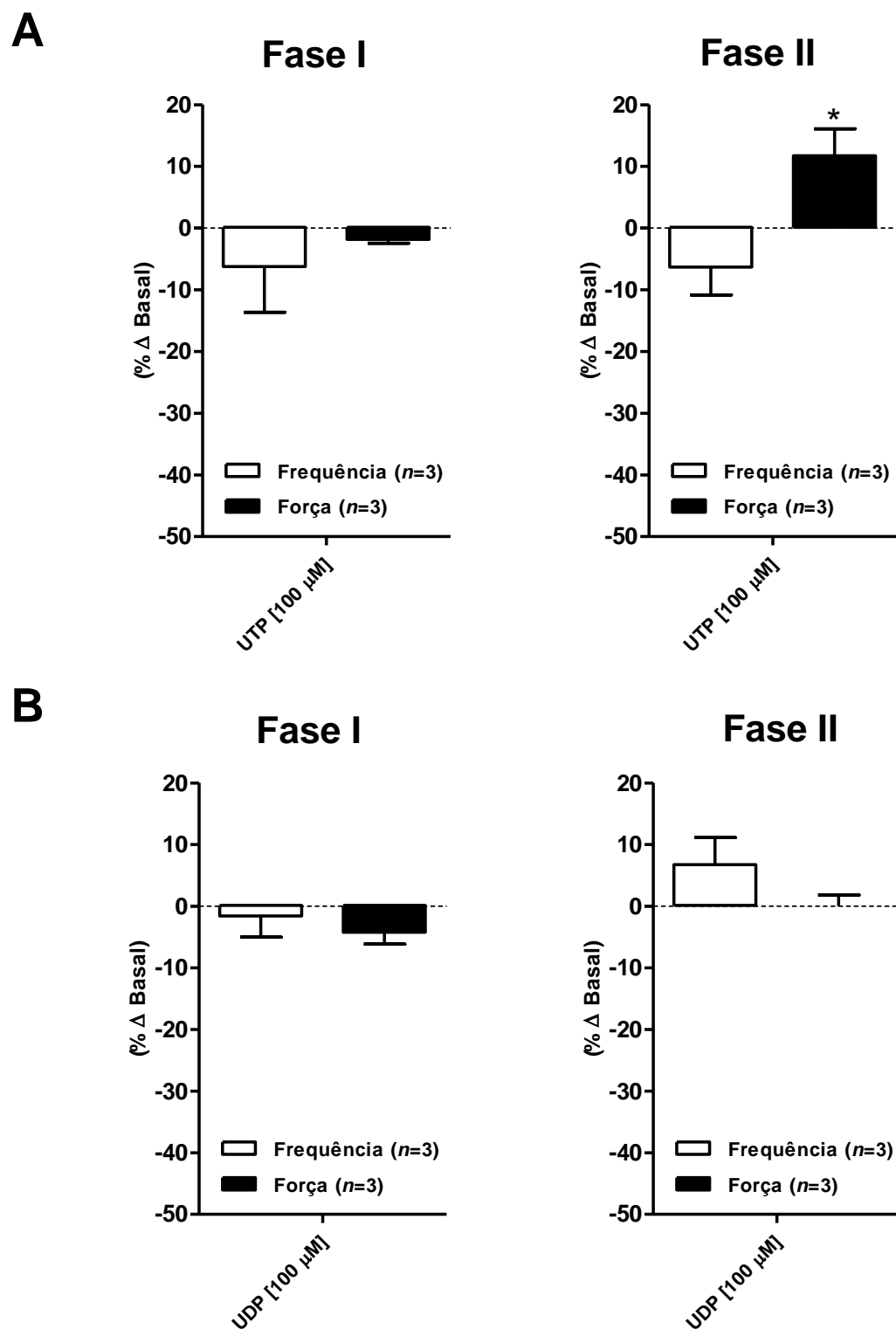


Fig. 24 – Representação gráfica do efeito do UTP e UDP (100 μM) (A e B, respetivamente) sobre a frequência e a força de contração das aurículas isoladas de ratazana a contrair espontaneamente durante a Fase I e a Fase II. * $P < 0,05$ quando comparados com os valores de frequência e tensão basais (antes da aplicação do agonista).

V. CONCLUSÃO

Neste trabalho demonstrou-se, pela primeira vez, que os nucleótidos de adenina, nomeadamente o ATP, exercem um efeito cronotrópico negativo sustentado nas aurículas isoladas de ratazana a contrair espontaneamente. Este efeito é parcialmente dependente da ativação de recetores ionotrópicos do subtipo P2X4 e de recetores metabotrópicos A_1 ativados pela ADO resultante da metabolização extracelular dos nucleótidos de adenina pelas E-NTPDases. Para além deste efeito sobre a frequência de contração auricular espontânea, tanto o ATP como o ADP exercem efeitos inotrópicos negativos transitórios (Fase I), que recuperam em 2-3 minutos para valores ligeiramente superiores ao período imediatamente anterior à adição do nucleótido (Fase II), efeito inotrópico positivo. Enquanto o efeito inotrópico negativo produzido pelos nucleótidos de adenina na Fase I é semelhante ao causado pelo seu metabolito ativo, ADO, a redução da atividade contrátil causada pelo nucleósido não recupera durante o período de aplicação. Estas observações sustentam a hipótese de que o efeito do ATP / ADP sobre a força de contração auricular resulta do balanço entre a ativação de recetores P2, responsáveis pelo aumento da força de contração, e a ativação de recetores inibitórios do subtipo A_1 pela ADO formada endogenamente. As observações deste estudo sugerem, ainda, uma separação molecular entre os mecanismos responsáveis pelos efeitos crono- e inotrópicos dos nucleótidos nas aurículas isoladas de ratazana.

O equilíbrio entre a ativação de recetores inibitórios A_1 e excitatórios P2 pode ser alterado farmacologicamente: (1) inibindo o catabolismo extracelular dos nucleótidos pelas E-NTPDases e, consequentemente, a formação de ADO (incubação com POM-1); (2) bloqueando seletivamente os recetores intervenientes (e.g. 5'-BDBD, A-438079, MRS2179, DPCPX); ou (3) reforçando a sua atividade usando análogos estáveis do ATP (e.g. ATP γ S). Neste contexto, concluímos que o efeito inotrópico negativo do ATP na Fase I é maioritariamente mediado pela ativação de A_1 AR (bloqueados pela DPCPX). A magnitude do efeito inotrópico negativo pode ser, em parte, contrariada pela estimulação progressiva de recetores excitatórios dos subtipos P2X7 (bloqueado pelo A-438079), P2Y $_1$ (sensível ao ADP e bloqueado pelo MRS2179) e P2Y $_2$ (ativado pelo UTP) (ver Figura 25). É importante notar que a recuperação do efeito inotrópico do ATP / ADP (Fase II) não é uma consequência da redução da frequência auricular espontânea observada na Fase I, uma vez que a mesma foi observada em aurículas estimuladas eletricamente (*pacings* elétrico).

A contribuição de diversos recetores para um determinado efeito biológico causado por compostos relacionados (e.g. efeito cronotrópico negativo do ATP / ADP / ADO) dificulta a caracterização farmacológica dos mesmos utilizando agonistas e antagonistas. Neste contexto, detetou-se uma cooperação ainda mal definida entre os P2X4R e os A₁AR para explicar o efeito cronotrópico negativo do ATP (Figuras 20 e 21). Os resultados mostram que o efeito cronotrópico negativo do ATP e do seu análogo estável, ATPγS, foi prevenido pela DPCPX e este antagonista de A₁AR também preveniu por completo a potenciação do efeito do ATP na presença do modulador alostérico de P2X4R. Esta farmacologia “anómala” pode configurar a presença de heterodimerização entre estes dois recetores. Serão, por isso, necessários mais estudos para avaliar esta hipótese. Independentemente do mecanismo subjacente, vários autores têm sugerido que o aumento da expressão ou da ativação dos P2X4R pode representar uma nova estratégia terapêutica na insuficiência cardíaca (Yang *et al.*, 2004; Shen *et al.*, 2009). Contudo, os resultados obtidos neste estudo não apoiam essa hipótese, já que o modulador alostérico positivo utilizado neste trabalho, ivermectina, favoreceu o efeito cronotrópico negativo do ATP sem alterar a força de contração das aurículas isoladas a contrair espontaneamente. Infelizmente, por falta de agentes farmacológicos adequados, este trabalho não avaliou convenientemente o papel dos recetores ionotrópicos P2X5 na atividade contrátil espontânea das aurículas isoladas. Estes recetores são os mais expressos no tecido auricular, nomeadamente no nó SA, e promovem a elevação dos níveis intracelulares de Ca²⁺.

Em conclusão, os efeitos dos nucleótidos da adenina sobre a contratilidade espontânea das aurículas resultam do balanço entre a ativação de diversos recetores purinérgicos, P2 sensíveis aos nucleótidos e P1 estimulados pela ADO resultante do catabolismo extracelular do ATP. Por conseguinte, o conhecimento da distribuição espacial dos vários intervenientes na cascata purinérgica, tais como sistemas de transporte, enzimas e recetores específicos, é fundamental para antecipar as respostas biológicas dos vários agentes e, também, para delinear estratégias inteligentes para o tratamento de diversas doenças cardíacas. O conhecimento aprofundado destes mecanismos de regulação fina da atividade auricular permitirá depurar farmacologicamente os efeitos indesejáveis (e.g. redução abrupta da frequência cardíaca ou da força de contração) mantendo aqueles considerados benéficos em determinadas condições fisiopatológicas.

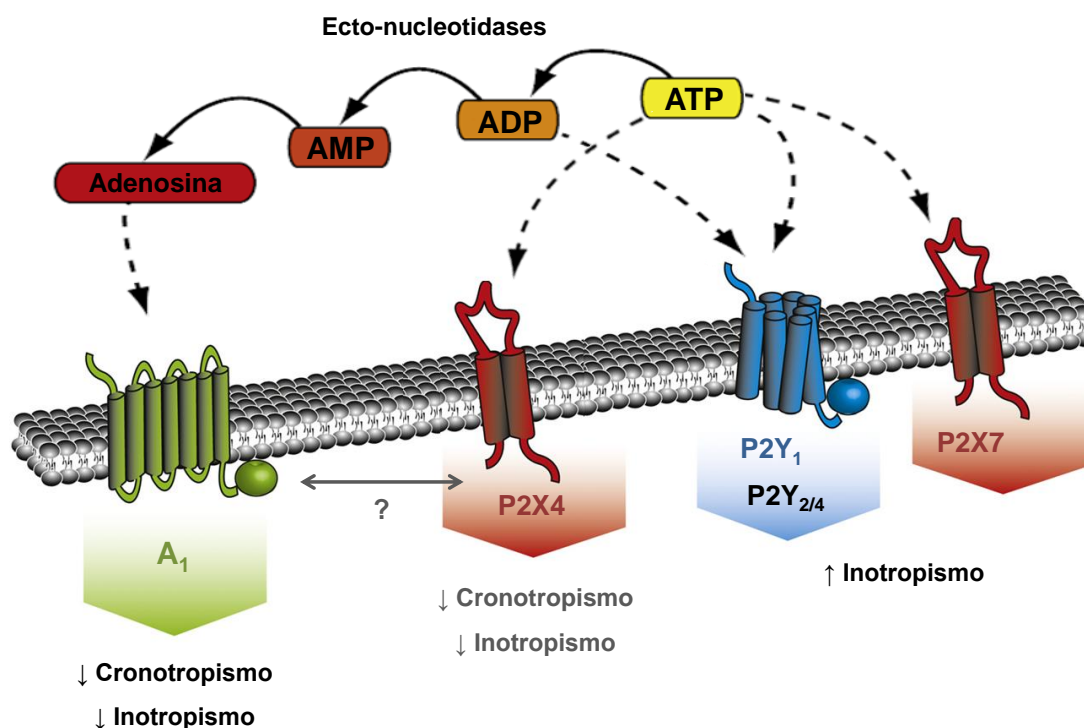


Fig. 25 – Representação esquemática do mecanismo hipotético responsável pelo efeito cronotrópico negativo monofásico e pelo efeito inotrópico bifásico do ATP em aurículas isoladas de ratazana a contrair espontaneamente. As linhas descontínuas representam possíveis ligações e a dupla seta representa possível interação entre recetores.

O ATP atuando via recetores purinérgicos P2 desencadeia diferentes efeitos. A ativação do P2X₇R (sensível ao ATP) e do P2Y₁R (sensível ao ATP e ADP) desencadeia efeitos inotrópicos positivos; a ativação do P2X₄R pode desencadear efeitos crono- e inotrópicos negativos, provavelmente por interação destes com os A₁AR; Por outro lado, o ATP é metabolizado a ADO por ação das ecto-nucleotidasas. A ADO por via de A₁AR exerce efeitos crono- e inotrópicos negativos que mascaram a componente P2. Adicionalmente o ATP pode atuar sobre os recetores P2Y₂ ou P2Y₄ que exercem apenas um aumento na força de contração auricular (inotropismo positivo).

VI. BIBLIOGRAFIA

- Alberts B, Bray D, Hopkin K, Johnson A, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K & Walter P (2004) *Essential Cell Biology*, 2 ed.
- Alvarez JL, Mongo K, Scamps F & Vassort G. 1990. Effects of purinergic stimulation on the Ca current in single frog cardiac cells. *Pflugers Arch* 416: 189-195.
- Armstrong AW & Clapham DE (2008) Pharmacology of Cardiac Rhythm. In *Principles of Cardiovascular Pharmacology*, pp. 307-328 [LW Wilkins, editor].
- Balazs B, Danko T, Kovacs G, Koles L, Hediger MA & Zsembery A. 2013. Investigation of the inhibitory effects of the benzodiazepine derivative, 5-BDBD on P2X4 purinergic receptors by two complementary methods. *Cell Physiol Biochem* 32: 11-24.
- Balogh J, Wihlborg AK, Isackson H, Joshi BV, Jacobson KA, Arner A & Erlinge D. 2005. Phospholipase C and cAMP-dependent positive inotropic effects of ATP in mouse cardiomyocytes via P2Y₁₁-like receptors. *J Mol Cell Cardiol* 39: 223-230.
- Barth K, Pflieger C, Linge A, Sim JA, Surprenant A, Steinbronn N, Strasser RH & Kasper M. 2010. Increased P2X₇R expression in atrial cardiomyocytes of caveolin-1 deficient mice. *Histochem Cell Biol* 134: 31-38.
- Bean BP. 1992. Pharmacology and electrophysiology of ATP-activated ion channels. *Trends Pharmacol Sci* 13: 87-90.
- Belardinelli L & Isenberg G. 1983. Isolated atrial myocytes: adenosine and acetylcholine increase potassium conductance. *Am J Physiol* 244: H734-737.
- Belhassen B & Pelleg A. 1984. Electrophysiologic effects of adenosine triphosphate and adenosine on the mammalian heart: clinical and experimental aspects. *J Am Coll Cardiol* 4: 414-424.
- Berne RM. 1963. Cardiac nucleotides in hypoxia: possible role in regulation of coronary blood flow. *Am J Physiol* 204: 317-322.
- Bilalova GA, Anikina TA, Sitdikov FG & Giniatullin RA. 2000. Effect of exogenous ATP on cardiac activity in rats. *Bull Exp Biol Med* 129: 320-322.
- Bjornsson OG, Monck JR & Williamson JR. 1989. Identification of P2Y purinoceptors associated with voltage-activated cation channels in cardiac ventricular myocytes of the rat. *Eur J Biochem* 186: 395-404.
- Blomstrom-Lundqvist C, Scheinman MM, Aliot EM, Alpert JS, Calkins H, Camm AJ, Campbell WB, Haines DE, Kuck KH, Lerman BB, Miller DD, Shaeffer CW, Stevenson WG, Tomaselli GF, Antman EM, Smith SC, Jr., Faxon DP, Fuster V,

- Gibbons RJ, Gregoratos G, Hiratzka LF, Hunt SA, Jacobs AK, Russell RO, Jr., Priori SG, Blanc JJ, Budaj A, Burgos EF, Cowie M, Deckers JW, Garcia MA, Klein WW, Lekakis J, Lindahl B, Mazzotta G, Morais JC, Oto A, Smiseth O & Trappe HJ. 2003. ACC/AHA/ESC guidelines for the management of patients with supraventricular arrhythmias--executive summary. a report of the American college of cardiology/American heart association task force on practice guidelines and the European society of cardiology committee for practice guidelines (writing committee to develop guidelines for the management of patients with supraventricular arrhythmias) developed in collaboration with NASPE-Heart Rhythm Society. *J Am Coll Cardiol* 42: 1493-1531.
- Boeynaems JM & Pearson JD. 1990. P2 purinoceptors on vascular endothelial cells: physiological significance and transduction mechanisms. *Trends Pharmacol Sci* 11: 34-37.
- Bogdanov Y, Rubino A & Burnstock G. 1998. Characterisation of subtypes of the P2X and P2Y families of ATP receptors in the foetal human heart. *Life Sci* 62: 697-703.
- Bohm M, Bruckner R, Neumann J, Schmitz W, Scholz H & Starbatty J. 1986. Role of guanine nucleotide-binding protein in the regulation by adenosine of cardiac potassium conductance and force of contraction. Evaluation with pertussis toxin. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 332: 403-405.
- Borst MM & Schrader J. 1991. Adenine nucleotide release from isolated perfused guinea pig hearts and extracellular formation of adenosine. *Circ Res* 68: 797-806.
- Bragança B (2012) New insights into adenosine's chronoselective atrial depressant effect. The interplay of adenosine A1 receptor with ion channels and signaling enzymes. Tese de Mestrado, Universidade do Porto.
- Bramich NJ, Edwards FR & Hirst GD. 1990. Sympathetic nerve stimulation and applied transmitters on the sinus venosus of the toad. *J Physiol* 429: 349-375.
- Braun OO, Lu D, Aroonsakool N & Insel PA. 2010. Uridine triphosphate (UTP) induces profibrotic responses in cardiac fibroblasts by activation of P2Y2 receptors. *J Mol Cell Cardiol* 49: 362-369.
- Brodde OEM, M. C. 1999. Adrenergic and muscarinic receptors in the human heart. *Pharmacol Rev* 51: 651-690.
- Bruns RF, Fergus JH, Badger EW, Bristol JA, Santay LA, Hartman JD, Hays SJ & Huang CC. 1987. Binding of the A1-selective adenosine antagonist 8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine to rat brain membranes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 335: 59-63.

- Burnstock G. 1972. Purinergic nerves. *Pharmacol Rev* 24: 509-581.
- Burnstock G (1978) A basis for distinguishing two types of purinergic receptor. In *Cell membrane receptors for drugs and hormones: a multidisciplinary approach*, pp. 107-118 [RWB Straub, L., editor]. New York: Raven Press.
- Burnstock G. 1980. Purinergic receptors in the heart. *Circ Res* 46: 1175-182.
- Burnstock G. 1996. P2 purinoceptors: historical perspective and classification. *Ciba Found Symp* 198: 1-28; discussion 29-34.
- Burnstock G. 2004. Introduction: P2 receptors. *Curr Top Med Chem* 4: 793-803.
- Burnstock G. 2007. Purine and pyrimidine receptors. *Cell Mol Life Sci* 64: 1471-1483.
- Burnstock G, Campbell G, Satchell D & Smythe A. 1970. Evidence that adenosine triphosphate or a related nucleotide is the transmitter substance released by non-adrenergic inhibitory nerves in the gut. *Br J Pharmacol* 40: 668-688.
- Burnstock G, Fredholm BB, North RA & Verkhatsky A. 2010. The birth and postnatal development of purinergic signalling. *Acta Physiol (Oxf)* 199: 93-147.
- Burnstock G & Kennedy C. 1985. Is there a basis for distinguishing two types of P2-purinoceptor? *Gen Pharmacol* 16: 433-440.
- Burnstock G & Meghji P. 1981. Distribution of P1- and P2-purinoceptors in the guinea-pig and frog heart. *Br J Pharmacol* 73: 879-885.
- Burnstock G & Meghji P. 1983. The effect of adenylyl compounds on the rat heart. *Br J Pharmacol* 79: 211-218.
- Cerbai E, Klockner U & Isenberg G. 1988. Ca-antagonistic effects of adenosine in guinea pig atrial cells. *Am J Physiol* 255: H872-878.
- Chang K, Hanaoka K, Kumada M & Takuwa Y. 1995. Molecular cloning and functional analysis of a novel P2 nucleotide receptor. *J Biol Chem* 270: 26152-26158.
- Charest R, Blackmore PF & Exton JH. 1985. Characterization of responses of isolated rat hepatocytes to ATP and ADP. *J Biol Chem* 260: 15789-15794.
- Chiba S & Himori N. 1975. Different inotropic responses to adenosine on the atrial and ventricular muscle of the dog heart. *Jpn J Pharmacol* 25: 489-491.
- Christie A, Sharma VK & Sheu SS. 1992. Mechanism of extracellular ATP-induced increase of cytosolic Ca²⁺ concentration in isolated rat ventricular myocytes. *J Physiol* 445: 369-388.
- Clemens MG & Forrester T. 1981. Appearance of adenosine triphosphate in the coronary sinus effluent from isolated working rat heart in response to hypoxia. *J Physiol* 312: 143-158.
- Cohen B, Liu YX, Druker B, Roberts TM & Schaffhausen BS. 1990. Characterization of pp85, a target of oncogenes and growth factor receptors. *Mol Cell Biol* 10: 2909-2915.

- Cohen R, Shainberg A, Hochhauser E, Cheporko Y, Tobar A, Birk E, Pinhas L, Leipziger J, Don J & Porat E. 2011. UTP reduces infarct size and improves mice heart function after myocardial infarct via P2Y2 receptor. *Biochem Pharmacol* 82: 1126-1133.
- Communi D, Govaerts C, Parmentier M & Boeynaems JM. 1997. Cloning of a human purinergic P2Y receptor coupled to phospholipase C and adenylyl cyclase. *J Biol Chem* 272: 31969-31973.
- Communi D, Motte S, Boeynaems JM & Piroton S. 1996a. Pharmacological characterization of the human P2Y4 receptor. *Eur J Pharmacol* 317: 383-389.
- Communi D, Parmentier M & Boeynaems JM. 1996b. Cloning, functional expression and tissue distribution of the human P2Y6 receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 222: 303-308.
- Communi D, Robaye B & Boeynaems JM. 1999. Pharmacological characterization of the human P2Y11 receptor. *Br J Pharmacol* 128: 1199-1206.
- Danziger RS, Raffaelli S, Moreno-Sanchez R, Sakai M, Capogrossi MC, Spurgeon HA, Hansford RG & Lakatta EG. 1988. Extracellular ATP has a potent effect to enhance cytosolic calcium and contractility in single ventricular myocytes. *Cell Calcium* 9: 193-199.
- De Young MB & Scarpa A. 1989. ATP receptor-induced Ca²⁺ transients in cardiac myocytes: sources of mobilized Ca²⁺. *Am J Physiol* 257: C750-758.
- Dorigo P, Gaion RM & Maragno I. 1988. Negative and positive influences exerted by purine compounds on isolated guinea-pig atria. *J Auton Pharmacol* 8: 191-196.
- Drury AN & Szent-Gyorgyi A. 1929. The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart. *J Physiol* 68: 213-237.
- Duarte-Araújo M (2011) Endogenous Purines As Potential Pharmacological Targets To Control Myenteric Neurotransmission. Tese de doutoramento em Ciências Biomédicas.
- Duarte-Araujo M, Nascimento C, Timoteo MA, Magalhaes-Cardoso MT & Correia-de-Sa P. 2009. Relative contribution of ecto-ATPase and ecto-ATPDase pathways to the biphasic effect of ATP on acetylcholine release from myenteric motoneurons. *Br J Pharmacol* 156: 519-533.
- Dzimiri N. 2002. Receptor crosstalk. Implications for cardiovascular function, disease and therapy. *Eur J Biochem* 269: 4713-4730.
- Eltzschig HK. 2009. Adenosine: an old drug newly discovered. *Anesthesiology* 111: 904-915.

- Erlinge D. 1998. Extracellular ATP: a growth factor for vascular smooth muscle cells. *Gen Pharmacol* 31: 1-8.
- Erlinge D & Burnstock G. 2008. P2 receptors in cardiovascular regulation and disease. *Purinergic Signal* 4: 1-20.
- Erlinge D, Harnek J, van Heusden C, Olivecrona G, Jern S & Lazarowski E. 2005. Uridine triphosphate (UTP) is released during cardiac ischemia. *Int J Cardiol* 100: 427-433.
- Fabiato A & Fabiato F. 1978. Effects of pH on the myofilaments and the sarcoplasmic reticulum of skinned cells from cardiac and skeletal muscles. *J Physiol* 276: 233-255.
- Filtz TM, Li Q, Boyer JL, Nicholas RA & Harden TK. 1994. Expression of a cloned P2Y purinergic receptor that couples to phospholipase C. *Mol Pharmacol* 46: 8-14.
- Fischer Y, Becker C & Loken C. 1999. Purinergic inhibition of glucose transport in cardiomyocytes. *J Biol Chem* 274: 755-761.
- Flitney FW & Singh J. 1980. Inotropic responses of the frog ventricle to adenosine triphosphate and related changes in endogenous cyclic nucleotides. *J Physiol* 304: 21-42.
- Ford WR & Broadley KJ. 1999. Effects of K(+)-channel blockers on A1-adenosine receptor-mediated negative inotropy and chronotropy of guinea-pig isolated left and right atria. *Fundam Clin Pharmacol* 13: 320-329.
- Forrester T & Williams CA. 1977. Release of adenosine triphosphate from isolated adult heart cells in response to hypoxia. *J Physiol* 268: 371-390.
- Fredholm BB. 2007. Adenosine, an endogenous distress signal, modulates tissue damage and repair. *Cell Death Differ* 14: 1315-1323.
- Fredholm BB, Abbracchio MP, Burnstock G, Daly JW, Harden TK, Jacobson KA, Leff P & Williams M. 1994. Nomenclature and classification of purinoceptors. *Pharmacol Rev* 46: 143-156.
- Fredholm BB, Abbracchio MP, Burnstock G, Dubyak GR, Harden TK, Jacobson KA, Schwabe U & Williams M. 1997. Towards a revised nomenclature for P1 and P2 receptors. *Trends Pharmacol Sci* 18: 79-82.
- Fredholm BB, AP IJ, Jacobson KA, Klotz KN & Linden J. 2001. International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol Rev* 53: 527-552.
- Fredholm BB, Hedqvist P, Lindstrom K & Wennmalm M. 1982. Release of nucleosides and nucleotides from the rabbit heart by sympathetic nerve stimulation. *Acta Physiol Scand* 116: 285-295.

- Freeman K, Tsui P, Moore D, Emson PC, Vawter L, Naheed S, Lane P, Bawagan H, Herrity N, Murphy K, Sarau HM, Ames RS, Wilson S, Livi GP & Chambers JK. 2001. Cloning, pharmacology, and tissue distribution of G-protein-coupled receptor GPR105 (KIAA0001) rodent orthologs. *Genomics* 78: 124-128.
- Friel DD & Bean BP. 1988. Two ATP-activated conductances in bullfrog atrial cells. *J Gen Physiol* 91: 1-27.
- Froldi G, Galzignato G, Zanetti M, Montopoli M, Dorigo P & Caparrotta L. 2005. Are prostanoids related to positive inotropism by UTP and ATP? *Pharmacology* 73: 140-145.
- Froldi G, Pandolfo L, Chinellato A, Ragazzi E, Caparrotta L & Fassina G. 1994. Dual effect of ATP and UTP on rat atria: which types of receptors are involved? *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 349: 381-386.
- Froldi G, Ragazzi E & Caparrotta L. 2001. Do ATP and UTP involve cGMP in positive inotropism on rat atria? *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 128: 265-274.
- Froldi G, Varani K, Chinellato A, Ragazzi E, Caparrotta L & Borea PA. 1997. P2X-purinoceptors in the heart: actions of ATP and UTP. *Life Sci* 60: 1419-1430.
- Ganong W (2003) *Review of Medical Physiology*, 21 ed.
- Gendron FP, Benrezzak O, Krugh BW, Kong Q, Weisman GA & Beaudoin AR. 2002. Purine signaling and potential new therapeutic approach: possible outcomes of NTPDase inhibition. *Curr Drug Targets* 3: 229-245.
- Gergs U, Boknik P, Schmitz W, Simm A, Silber RE & Neumann J. 2008. A positive inotropic effect of ATP in the human cardiac atrium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294: H1716-1723.
- Gergs U, Boknik P, Schmitz W, Simm A, Silber RE & Neumann J. 2009. A positive inotropic effect of adenosine in cardiac preparations of right atria from diseased human hearts. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 379: 533-540.
- Golan DT, J.A.H.; Armstrong, E.J.; Armstrong, A.W. (2012) Pharmacology of Cardiac Rhythm. In *Principles of Cardiovascular Pharmacology* [LW Wilkins, editor].
- Gordon JL. 1986. Extracellular ATP: effects, sources and fate. *Biochem J* 233: 309-319.
- Goto M, Yatani A & Tsuda Y. 1976. Effects of ATP on the membrane currents and tension components of bullfrog atrial muscle. *Nihon Seirigaku Zasshi* 38: 503-506.
- Gourine AV, Wood JD & Burnstock G. 2009. Purinergic signalling in autonomic control. *Trends Neurosci* 32: 241-248.

- Grenz A, Zhang H, Hermes M, Eckle T, Klingel K, Huang DY, Muller CE, Robson SC, Osswald H & Eltzschig HK. 2007. Contribution of E-NTPDase1 (CD39) to renal protection from ischemia-reperfusion injury. *FASEB J* 21: 2863-2873.
- Gupta RC, Neumann J, Durant P & Watanabe AM. 1993a. A1-adenosine receptor-mediated inhibition of isoproterenol-stimulated protein phosphorylation in ventricular myocytes. Evidence against a cAMP-dependent effect. *Circ Res* 72: 65-74.
- Gupta RC, Neumann J & Watanabe AM. 1993b. Comparison of adenosine and muscarinic receptor-mediated effects on protein phosphatase inhibitor-1 activity in the heart. *J Pharmacol Exp Ther* 266: 16-22.
- Guyton ACH, John E. (2006) *Textbook of Medical Physiology*, 11 ed.
- Hall JEG, Arthur C. (2006) *Textbook of Medical Physiology*, 11 ed.
- Headrick JP, Ashton KJ, Rose'meyer RB & Peart JN. 2013. Cardiovascular adenosine receptors: Expression, actions and interactions. *Pharmacol Ther* 140: 92-111.
- Hirano Y, Abe S, Sawanobori T & Hiraoka M. 1991. Arachidonic acid induced increase in intracellular free calcium in guinea-pig hepatocytes. *Jpn J Physiol* 41: 327-332.
- Hollander PB & Webb JL. 1957. Effects of adenine nucleotides on the contractility and membrane potentials of rat atrium. *Circ Res* 5: 349-353.
- Hopkins SV. 1973. The action of ATP in the guinea-pig heart. *Biochem Pharmacol* 22: 335-339.
- Horackova M, Huang MH & Armour JA. 1994. Purinergic modulation of adult guinea pig cardiomyocytes in long term cultures and co-cultures with extracardiac or intrinsic cardiac neurones. *Cardiovasc Res* 28: 673-679.
- Hoyle CH & Burnstock G. 1986. Evidence that ATP is a neurotransmitter in the frog heart. *Eur J Pharmacol* 124: 285-289.
- Hu B, Mei QB, Yao XJ, Smith E, Barry WH & Liang BT. 2001. A novel contractile phenotype with cardiac transgenic expression of the human P2X4 receptor. *FASEB J* 15: 2739-2741.
- Hu B, Senkler C, Yang A, Soto F & Liang BT. 2002. P2X4 receptor is a glycosylated cardiac receptor mediating a positive inotropic response to ATP. *J Biol Chem* 277: 15752-15757.
- Iaizzo PA (2009) *Handbook of Cardiac Anatomy, Physiology and Devices*, 2 ed.
- Ingwall JS. 2007. On substrate selection for ATP synthesis in the failing human myocardium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293: H3225-3226.
- Jacobson KA. 2009. Introduction to adenosine receptors as therapeutic targets. *Handb Exp Pharmacol*: 1-24.

- Jacobson KA. 2010. P2X and P2Y Receptors. *TOCRIS Bioscience*.
- Jacobson KA, van Galen PJ & Williams M. 1992. Adenosine receptors: pharmacology, structure-activity relationships, and therapeutic potential. *J Med Chem* 35: 407-422.
- Jahnel U & Nawrath H. 1989. Characterization of adenosine receptors in guinea-pig isolated left atria. *Br J Pharmacol* 97: 1182-1190.
- Jiang L, Bardini M, Keogh A, dos Remedios CG & Burnstock G. 2005. P2X1 receptors are closely associated with connexin 43 in human ventricular myocardium. *Int J Cardiol* 98: 291-297.
- Jiang Z & Mangharam R (2013) University of Pennsylvania Develops Electrophysiological Heart Model for Real-Time Closed-Loop Testing of Pacemakers. Disponível em: <<http://www.mathworks.com/company/newsletters/articles/university-of-pennsylvania-develops-electrophysiological-heart-model-for-real-time-closed-loop-testing-of-pacemakers.html>>. Acesso em: Setembro de 2013.
- Jorgensen S. 1956. Breakdown of adenine and hypoxanthine nucleotides and nucleosides in human plasma. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)* 12: 294-302.
- Ju YK, Huang W, Jiang L, Barden JA & Allen DG. 2003. ATP modulates intracellular Ca²⁺ and firing rate through a P2Y1 purinoceptor in cane toad pacemaker cells. *J Physiol* 552: 777-787.
- Klabunde RE (2005) Electrical Activity of the Heart. In *Cardiovascular Physiology Concepts*, pp. 9-39 [LW Wilkins, editor]. Philadelphia.
- Kohler D, Eckle T, Faigle M, Grenz A, Mittelbronn M, Laucher S, Hart ML, Robson SC, Muller CE & Eltzschig HK. 2007. CD39/ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 provides myocardial protection during cardiac ischemia/reperfusion injury. *Circulation* 116: 1784-1794.
- Koles L, Gerevich Z, Oliveira JF, Zadori ZS, Wirkner K & Illes P. 2008. Interaction of P2 purinergic receptors with cellular macromolecules. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 377: 1-33.
- Koolman JR, K.H. (2005) *Color Atlas of Biochemistry*, 2 ed.
- Kukulski F, Levesque SA, Lavoie EG, Lecka J, Bigonnesse F, Knowles AF, Robson SC, Kirley TL & Sevigny J. 2005. Comparative hydrolysis of P2 receptor agonists by NTPDases 1, 2, 3 and 8. *Purinergic Signal* 1: 193-204.
- Kuz'min VS, Sukhova GS & Ashmarin IP. 2006. [Reversible inhibitory action of adenosine diphosphate ribose on isolated rat heart and rat heart in vivo]. *Kardiologija* 46: 39-45.

- Kuzmin AI, Lakomkin VL, Kapelko VI & Vassort G. 1998. Interstitial ATP level and degradation in control and postmyocardial infarcted rats. *Am J Physiol* 275: C766-771.
- Kwon HJ. 2012. Extracellular ATP signaling via P2X(4) receptor and cAMP/PKA signaling mediate ATP oscillations essential for prechondrogenic condensation. *J Endocrinol* 214: 337-348.
- Lazarowski ER, Shea DA, Boucher RC & Harden TK. 2003. Release of cellular UDP-glucose as a potential extracellular signaling molecule. *Mol Pharmacol* 63: 1190-1197.
- Legssyer A, Poggioli J, Renard D & Vassort G. 1988. ATP and other adenine compounds increase mechanical activity and inositol trisphosphate production in rat heart. *J Physiol* 401: 185-199.
- Lodish HB, A.; Matsudaira, P.; Kaiser, C.A.; Krieger, M.; Scott, M.P.; Zipursky, L.; Darnell, J. (2004) *Molecular Cell Biology*, 5 ed.
- Lohse MJ, Klotz KN, Lindenborn-Fotinos J, Reddington M, Schwabe U & Olsson RA. 1987. 8-Cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine (DPCPX)--a selective high affinity antagonist radioligand for A1 adenosine receptors. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol* 336: 204-210.
- Lundberg JM, Terenius L, Hokfelt T & Goldstein M. 1983. High levels of neuropeptide Y in peripheral noradrenergic neurons in various mammals including man. *Neurosci Lett* 42: 167-172.
- Lustig KD, Shiau AK, Brake AJ & Julius D. 1993. Expression cloning of an ATP receptor from mouse neuroblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 5113-5117.
- Lyashkov AE, Juhaszova M, Dobrzynski H, Vinogradova TM, Maltsev VA, Juhasz O, Spurgeon HA, Sollott SJ & Lakatta EG. 2007. Calcium cycling protein density and functional importance to automaticity of isolated sinoatrial nodal cells are independent of cell size. *Circ Res* 100: 1723-1731.
- MacMillan D, Kennedy C & McCarron JG. 2012. ATP inhibits Ins(1,4,5)P3-evoked Ca²⁺ release in smooth muscle via P2Y1 receptors. *J Cell Sci* 125: 5151-5158.
- Mantelli L, Amerini S, Filippi S & Ledda F. 1993. Blockade of adenosine receptors unmasks a stimulatory effect of ATP on cardiac contractility. *Br J Pharmacol* 109: 1268-1271.
- Matsuoka I & Ohkubo S. 2004. ATP- and adenosine-mediated signaling in the central nervous system: adenosine receptor activation by ATP through rapid and localized generation of adenosine by ecto-nucleotidases. *J Pharmacol Sci* 94: 95-99.

- Matsuura H & Ehara T. 1997. Selective enhancement of the slow component of delayed rectifier K⁺ current in guinea-pig atrial cells by external ATP. *J Physiol* 503 (Pt 1): 45-54.
- Mei Q & Liang BT. 2001. P2 purinergic receptor activation enhances cardiac contractility in isolated rat and mouse hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281: H334-341.
- Meldrum LA & Burnstock G. 1983. Evidence that ATP acts as a co-transmitter with noradrenaline in sympathetic nerves supplying the guinea-pig vas deferens. *Eur J Pharmacol* 92: 161-163.
- Metzler D (2001) *Biochemistry*, 2 ed.
- Morris AJ, Waldo GL, Downes CP & Harden TK. 1990. A receptor and G-protein-regulated polyphosphoinositide-specific phospholipase C from turkey erythrocytes. II. P2Y-purinergic receptor and G-protein-mediated regulation of the purified enzyme reconstituted with turkey erythrocyte ghosts. *J Biol Chem* 265: 13508-13514.
- Muller CE, Iqbal J, Baqi Y, Zimmermann H, Rollich A & Stephan H. 2006. Polyoxometalates--a new class of potent ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (NTPDase) inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* 16: 5943-5947.
- Murray RG, D.K.; Mayes, P.A.; Rodwell, V.W. (2003) *Harper's Illustrated Biochemistry*, 26 ed.
- Musa H, Tellez JO, Chandler NJ, Greener ID, Maczewski M, Mackiewicz U, Beresewicz A, Molenaar P, Boyett MR & Dobrzynski H. 2009. P2 purinergic receptor mRNA in rat and human sinoatrial node and other heart regions. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 379: 541-549.
- Musial DC, de Magalhaes Galvao K, Miranda-Ferreira R, Dantas da Silva Junior E, Caricati-Neto A, Jurkiewicz NH, Jurkiewicz A & Broetto Biazon AC. 2012. Alteration of purinergic neurotransmission in isolated atria of streptozotocin-induced diabetic rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 59: 158-164.
- Mustafa SJ, Morrison RR, Teng B & Pelleg A. 2009. Adenosine receptors and the heart: role in regulation of coronary blood flow and cardiac electrophysiology. *Handb Exp Pharmacol*: 161-188.
- Nakata H, Yoshioka K, Kamiya T, Tsuga H & Oyanagi K. 2005. Functions of heteromeric association between adenosine and P2Y receptors. *J Mol Neurosci* 26: 233-238.

- Needleman P, Minkes MS & Douglas JR, Jr. 1974. Stimulation of prostaglandin biosynthesis by adenine nucleotides. Profile of prostaglandin release by perfused organs. *Circ Res* 34: 455-460.
- Nguyen T, Erb L, Weisman GA, Marchese A, Heng HH, Garrad RC, George SR, Turner JT & O'Dowd BF. 1995. Cloning, expression, and chromosomal localization of the human uridine nucleotide receptor gene. *J Biol Chem* 270: 30845-30848.
- Nicholas RA, Lazarowski ER, Watt WC, Li Q, Boyer J & Harden TK. 1996a. Pharmacological and second messenger signalling selectivities of cloned P2Y receptors. *J Auton Pharmacol* 16: 319-323.
- Nicholas RA, Watt WC, Lazarowski ER, Li Q & Harden K. 1996b. Uridine nucleotide selectivity of three phospholipase C-activating P2 receptors: identification of a UDP-selective, a UTP-selective, and an ATP- and UTP-specific receptor. *Mol Pharmacol* 50: 224-229.
- O'Connor SE, Dainty IA & Leff P. 1991. Further subclassification of ATP receptors based on agonist studies. *Trends Pharmacol Sci* 12: 137-141.
- Olshansky B, Sabbah HN, Hauptman PJ & Colucci WS. 2008. Parasympathetic nervous system and heart failure: pathophysiology and potential implications for therapy. *Circulation* 118: 863-871.
- Olsson RA & Pearson JD. 1990. Cardiovascular purinoceptors. *Physiol Rev* 70: 761-845.
- Parr CE, Sullivan DM, Paradiso AM, Lazarowski ER, Burch LH, Olsen JC, Erb L, Weisman GA, Boucher RC & Turner JT. 1994. Cloning and expression of a human P2U nucleotide receptor, a target for cystic fibrosis pharmacotherapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 13067.
- Pearson JD & Gordon JL. 1979. Vascular endothelial and smooth muscle cells in culture selectively release adenine nucleotides. *Nature* 281: 384-386.
- Pelleg A & Belhassen B. 2010. The mechanism of the negative chronotropic and dromotropic actions of adenosine 5'-triphosphate in the heart: an update. *J Cardiovasc Pharmacol* 56: 106-109.
- Pelleg A, Hurt CM & Michelson EL. 1990. Cardiac effects of adenosine and ATP. *Ann N Y Acad Sci* 603: 19-30.
- Pham TM, Morris JB, Arthur JF, Post GR, Brown JH & Woodcock EA. 2003. UTP but not ATP causes hypertrophic growth in neonatal rat cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 35: 287-292.

- Phaneuf S, Berta P, Casanova J & Cavadore JC. 1987. ATP stimulates inositol phosphates accumulation and calcium mobilization in a primary culture of rat aortic myocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 143: 454-460.
- Podrasky E, Xu D & Liang BT. 1997. A novel phospholipase C- and cAMP-independent positive inotropic mechanism via a P2 purinoceptor. *Am J Physiol* 273: H2380-2387.
- Priel A & Silberberg SD. 2004. Mechanism of ivermectin facilitation of human P2X4 receptor channels. *J Gen Physiol* 123: 281-293.
- Puceat M, Bony C, Jaconi M & Vassort G. 1998. Specific activation of adenylyl cyclase V by a purinergic agonist. *FEBS Lett* 431: 189-194.
- Puceat M, Clement-Chomienne O, Terzic A & Vassort G. 1993. Alpha 1-adrenoceptor and purinoceptor agonists modulate Na-H antiport in single cardiac cells. *Am J Physiol* 264: H310-319.
- Puceat M & Vassort G. 1995. Neurohumoral modulation of intracellular pH in the heart. *Cardiovasc Res* 29: 178-183.
- Qu Y, Campbell DL & Strauss HC. 1993. Modulation of L-type Ca²⁺ current by extracellular ATP in ferret isolated right ventricular myocytes. *J Physiol* 471: 295-317.
- Ralevic V & Burnstock G. 1991. Roles of P2-purinoceptors in the cardiovascular system. *Circulation* 84: 1-14.
- Ralevic V & Burnstock G. 1998. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev* 50: 413-492.
- Rittiner JE, Korboukh I, Hull-Ryde EA, Jin J, Janzen WP, Frye SV & Zylka MJ. 2012. AMP is an adenosine A1 receptor agonist. *J Biol Chem* 287: 5301-5309.
- Robson SC, Sevigny J & Zimmermann H. 2006. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. *Purinergic Signal* 2: 409-430.
- Saito D, Ueeda M, Abe Y, Tani H, Nakatsu T, Yoshida H, Haraoka S & Nagashima H. 1986. Treatment of paroxysmal supraventricular tachycardia with intravenous injection of adenosine triphosphate. *Br Heart J* 55: 291-294.
- Scamps F, Legssyer A, Mayoux E & Vassort G. 1990. The mechanism of positive inotropy induced by adenosine triphosphate in rat heart. *Circ Res* 67: 1007-1016.
- Scamps F & Vassort G. 1994. Pharmacological profile of the ATP-mediated increase in L-type calcium current amplitude and activation of a non-specific cationic current in rat ventricular cells. *Br J Pharmacol* 113: 982-986.

- Scanlon VCS, T. (2007) The Heart. In *Essentials of anatomy and physiology*, pp. 273-289 [D Company, editor]. Philadelphia: F.A.
- Shen JB, Pappano AJ & Liang BT. 2006. Extracellular ATP-stimulated current in wild-type and P2X4 receptor transgenic mouse ventricular myocytes: implications for a cardiac physiologic role of P2X4 receptors. *FASEB J* 20: 277-284.
- Shen JB, Shutt R, Agosto M, Pappano A & Liang BT. 2009. Reversal of cardiac myocyte dysfunction as a unique mechanism of rescue by P2X4 receptors in cardiomyopathy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 296: H1089-1095.
- Shen JB, Shutt R, Pappano A & Liang BT. 2007. Characterization and mechanism of P2X receptor-mediated increase in cardiac myocyte contractility. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293: H3056-3062.
- Shoda M, Hagiwara N, Kasanuki H & Hosoda S. 1997. ATP-activated cationic current in rabbit sino-atrial node cells. *J Mol Cell Cardiol* 29: 689-695.
- Stemmer P & Akera T. 1986. Concealed positive force-frequency relationships in rat and mouse cardiac muscle revealed by ryanodine. *Am J Physiol* 251: H1106-1110.
- Surprenant A & North RA. 2009. Signaling at purinergic P2X receptors. *Annu Rev Physiol* 71: 333-359.
- Szentmiklosi AJ, Cseppento A, Harmati G & Nanasi PP. 2011. Novel trends in the treatment of cardiovascular disorders: site- and event- selective adenosinergic drugs. *Curr Med Chem* 18: 1164-1187.
- Szigligeti P, Pankucsi C, Banyasz T, Varro A & Nanasi PP. 1996. Action potential duration and force-frequency relationship in isolated rabbit, guinea pig and rat cardiac muscle. *J Comp Physiol B* 166: 150-155.
- Ter Horst GJ (2000) *The Nervous System and the Heart*, 1 ed.
- Vahlensieck U, Boknik P, Knapp J, Linck B, Muller FU, Neumann J, Herzig S, Schluter H, Zidek W, Deng MC, Scheld HH & Schmitz W. 1996. Negative chronotropic and inotropic effects exerted by diadenosine hexaphosphate (AP6A) via A1-adenosine receptors. *Br J Pharmacol* 119: 835-844.
- van Calcar D, Muller M & Hamprecht B. 1979. Adenosine regulates via two different types of receptors, the accumulation of cyclic AMP in cultured brain cells. *J Neurochem* 33: 999-1005.
- Van De Graaff KMR, R.W. (2013) *Human Anatomy and Physiology - Schaum's Easy outlines*, 4 ed.
- Vasileiou E, Montero RM, Turner CM & Vergoulas G. 2010. P2X(7) receptor at the heart of disease. *Hippokratia* 14: 155-163.

- Vassort G. 2001. Adenosine 5'-triphosphate: a P2-purinergic agonist in the myocardium. *Physiol Rev* 81: 767-806.
- Vessey DA, Li L & Kelley M. 2011. P2X7 receptor agonists pre- and postcondition the heart against ischemia-reperfusion injury by opening pannexin-1/P2X(7) channels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 301: H881-887.
- Vial C, Owen P, Opie LH & Posel D. 1987. Significance of release of adenosine triphosphate and adenosine induced by hypoxia or adrenaline in perfused rat heart. *J Mol Cell Cardiol* 19: 187-197.
- von Kugelgen I. 2006. Pharmacological profiles of cloned mammalian P2Y-receptor subtypes. *Pharmacol Ther* 110: 415-432.
- von Kugelgen I & Wetter A. 2000. Molecular pharmacology of P2Y-receptors. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 362: 310-323.
- Wee S, Peart JN & Headrick JP. 2007. P2 purinoceptor-mediated cardioprotection in ischemic-reperfused mouse heart. *J Pharmacol Exp Ther* 323: 861-867.
- Welford LA, Cusack NJ & Hourani SM. 1987. The structure-activity relationships of ectonucleotidases and of excitatory P2-purinoceptors: evidence that dephosphorylation of ATP analogues reduces pharmacological potency. *Eur J Pharmacol* 141: 123-130.
- of UTP in man during myocardial infarction. *Circ Res* 98: 970-976.
- Wu SN, Liu SI & Hwang TL. 1998. Activation of muscarinic K⁺ channels by extracellular ATP and UTP in rat atrial myocytes. *J Cardiovasc Pharmacol* 31: 203-211.
- Yang A, Sonin D, Jones L, Barry WH & Liang BT. 2004. A beneficial role of cardiac P2X4 receptors in heart failure: rescue of the calsequestrin overexpression model of cardiomyopathy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287: H1096-1103.
- Yang R & Liang BT. 2012. Cardiac P2X(4) receptors: targets in ischemia and heart failure? *Circ Res* 111: 397-401.
- Yegutkin GG. 2008. Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade. *Biochim Biophys Acta* 1783: 673-694.
- Yitzhaki S, Shneyvays V, Jacobson KA & Shainberg A. 2005. Involvement of uracil nucleotides in protection of cardiomyocytes from hypoxic stress. *Biochem Pharmacol* 69: 1215-1223.
- Yoshioka K, Hosoda R, Kuroda Y & Nakata H. 2002. Hetero-oligomerization of adenosine A1 receptors with P2Y1 receptors in rat brains. *FEBS Lett* 531: 299-303.

- Yoshioka K, Saitoh O & Nakata H. 2001. Heteromeric association creates a P2Y-like adenosine receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 7617-7622.
- Zheng JS, Boluyt MO, Long X, O'Neill L, Lakatta EG & Crow MT. 1996. Extracellular ATP inhibits adrenergic agonist-induced hypertrophy of neonatal cardiac myocytes. *Circ Res* 78: 525-535.
- Zheng JS, Christie A, De Young MB, Levy MN & Scarpa A. 1992. Synergism between cAMP and ATP in signal transduction in cardiac myocytes. *Am J Physiol* 262: C128-135.
- Zimmermann H. 2000. Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 362: 299-309.

VII.ANEXOS

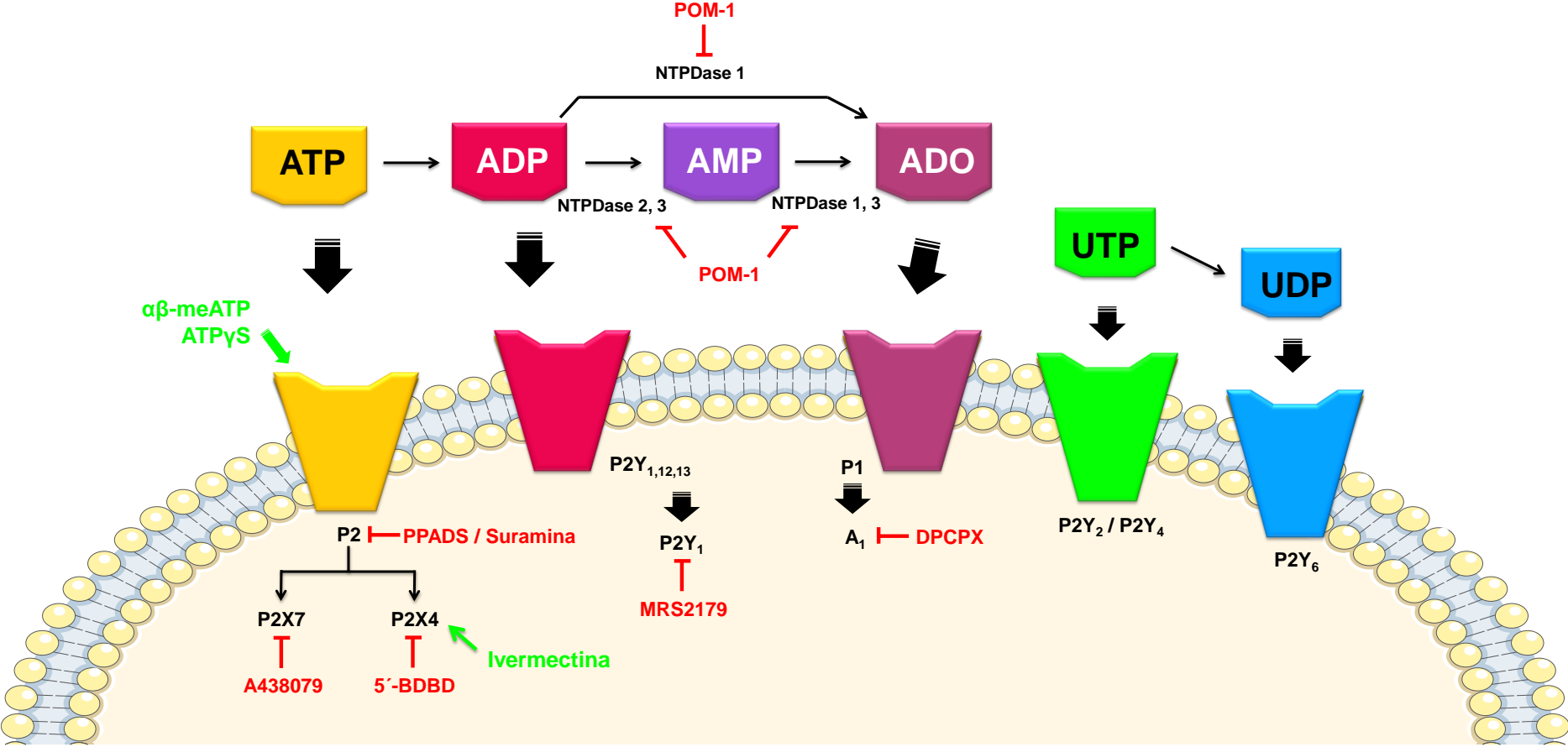


Fig. 26 – Representação esquemática global da ação dos nucleótidos de adenina e uracilo e dos restantes fármacos usados (agonistas, antagonistas e inibidores) sobre os recetores purinérgicos P1 e P2 e sobre as enzimas responsáveis pela metabolização dos nucleótidos de adenina. A ação dos agonistas e antagonistas/inibidores utilizados distingue-se pela cor verde e vermelha, respetivamente.